

# ANNALES

## DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

**E. DUCLAUX**

---

### COMITÉ DE RÉDACTION

**D<sup>r</sup> CALMETTE**, sous-directeur de l'Institut Pasteur ;

**D<sup>r</sup> L. MARTIN**, sous-directeur de l'Institut Pasteur ;

**D<sup>r</sup> ROUX**, directeur de l'Institut Pasteur ;

**D<sup>r</sup> VAILLARD**, membre de l'Académie de Médecine.

---

**TOME QUARANTE-HUITIÈME**

Janvier-Juin 1932

AVEC QUATRE PLANCHES

---

**PARIS**

**MASSON ET C<sup>ie</sup>, ÉDITEURS**

**LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE**

120, Boulevard Saint-Germain (6<sup>e</sup>).

QR

1

A475

v. 48

Jan.-June

1932

PER

---

PARIS. — A. MARETHEUX ET L. PACTAT. IMP., 1, RUE CASSETTE. — 1932.

---

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

---

## LES NOUVEAUX LABORATOIRES DE RECHERCHES SUR LA TUBERCULOSE ET DE PRÉPARATION DU BCG A L'INSTITUT PASTEUR

L'extension sans cesse croissante des divers services qui, à l'Institut Pasteur, s'occupent de recherches sur la tuberculose et qui assurent les préparations du vaccin BCG, de la tuberculine et de l'antigène méthylique de Boquet et Nègre, rendaient indispensable leur groupement et leur installation dans des locaux mieux appropriés et plus spacieux. Sur la proposition de M. Roux, le Conseil et l'Assemblée de l'Institut Pasteur décidèrent donc que, malgré les difficultés résultant des circonstances économiques, un vaste bâtiment serait édifié dans les jardins de l'Institut en bordure de la rue Falguière, et que tous les services de la tuberculose y seraient transférés aussitôt que possible. On résolut en même temps de prélever sur les fonds de réserve de l'Institut Pasteur une somme évaluée à environ 8 millions, jugée nécessaire pour cette construction. M. le président Raymond Poincaré et M. le sénateur Paul Strauss, ancien ministre de l'Hygiène, tous deux membres du Conseil, suggérèrent de solliciter du pari mutuel une subvention de 2 millions qui fut aussitôt accordée par M. Loucheur, alors ministre du Travail et de l'Hygiène.

Les plans furent établis avec le plus grand soin par M. Duquesne, prix de Rome, architecte du Gouvernement, qui ne put que commencer leur exécution (avril 1929), ayant été malheureusement emporté par une brusque maladie. La construction fut poursuivie et fort habilement achevée en octobre 1931, par M. Bitterlin, lui aussi architecte du Gouvernement.

En raison de l'importante surélévation de la rue Falguière par rapport aux jardins de l'Institut et à la rue Dutot, les nouveaux laboratoires occupent un vaste bâtiment rectangulaire, long de 70 mètres, de trois étages sur la rue Falguière et de cinq étages sur les jardins de l'Institut. Dans le sens de sa longueur, ce bâtiment est prolongé par deux annexes : l'une abrite les services du secrétariat et de la direction ; l'autre, les machines qui fournissent à l'établissement son chauffage, son éclairage et sa force motrice.

Lors de l'élaboration des plans, on s'est proposé tout d'abord de séparer nettement, d'une part les services du BCG, d'autre part les services de recherches sur les tuberculoses diverses, humaines et animales. Cette séparation devait être étendue, non seulement aux locaux, au matériel et au personnel, mais même aux étables d'animaux ainsi qu'aux salles d'autopsie et à leur instrumentation qui était prévue distincte. Toutes les précautions se trouvaient ainsi prises pour qu'il ne pût jamais s'établir de communication accidentelle ou de contact susceptible de souiller les cultures ou les animaux de contrôle du BCG avec des germes de tuberculoses virulentes.

L'entrée principale s'ouvre au n° 96 de la rue Falguière, sur un vestibule qui donne accès à une salle d'attente, au fichier du BCG, au secrétariat et au laboratoire particulier du professeur Calmette, chef des services. De là, on passe directement au service du BCG qui occupe tout le premier étage sur la rue Falguière, et qui est ainsi distribué :

*A droite :* a) Laboratoire général et ses annexes : préparation des milieux de culture du BCG, stérilisation, laverie, dépôt d'instruments, de verrerie et de produits chimiques ;

b) Deux laboratoires pour l'ensemencement du BCG et la préparation des émulsions vaccinales avec les appareils électriques rotatifs à billes d'acier au chrome, inoxydables.



c) Un laboratoire de répartition du BCG en ampoules, avec appareils distributeurs;

d) Un laboratoire des souffleries pour le scellement des ampoules;

e) Un grand laboratoire pour le conditionnement du BCG (vérification des ampoules, étiquetage, mise en boîtes);

A gauche : f) Une chambre de réfrigération pour la conservation du BCG;

g) Une grande salle d'emballage et d'expédition des boîtes de BCG;

h) Deux laboratoires occupés par M. Guérin, chef du service;

i) Un laboratoire réservé aux médecins étrangers venus à l'Institut Pasteur pour se familiariser avec les techniques de préparation et de contrôle du BCG;

j) Deux grandes chambres-étuves électriques à régulateurs, superposées, exclusivement réservées aux cultures du BCG;

k) Trois laboratoires pour les recherches et le contrôle expérimental du BCG (D<sup>r</sup> Nègre, chef du service; D<sup>r</sup> Noury, assistant).

On revient ainsi sur le palier du grand escalier, sur lequel se trouvent l'ascenseur et des vestiaires avec lavabos.

Le deuxième étage est tout entier affecté aux laboratoires de recherches. Il comprend, de droite à gauche :

a) Un économat;

b) Un vaste laboratoire général avec ses annexes pour la préparation des milieux de culture, stérilisation, laverie, etc.;

c) Un laboratoire où se trouvent réunies les collections des diverses souches de bacilles tuberculeux et paratuberculeux;

d) Un appareil frigorifique;

e) Deux laboratoires affectés spécialement à l'étude des éléments filtrables des bacilles tuberculeux (D<sup>r</sup> J. Valtis, chef de laboratoire, D<sup>r</sup> Van Deinse, assistant);

f) Un laboratoire de travaux pratiques où 24 travailleurs peuvent trouver place et se livrer à des recherches sur les diverses tuberculoses humaines ou animales, ayant à leur disposition tout le matériel instrumental qui peut leur être utile. Cette salle est transformable en salle de conférences. On peut y faire l'obscurité. Elle est pourvue d'un appareil à projections microscopiques directes;

g) Trois laboratoires pour le chef du service et ses assistants (M. Boquet, chef du service, D<sup>r</sup> Saenz, adjoint);

h) Deux chambres-étuves électriques superposées;

i) Trois laboratoires de recherches, dont un réservé aux médecins étrangers en stage à l'Institut Pasteur. Les deux autres sont affectés, l'un au D<sup>r</sup> Morax pour les recherches sur les tuberculoses oculaires, l'autre à la liaison avec les services hospitaliers de Paris, en particulier avec la clinique de la Tuberculose (prof. Léon Bernard) de l'Hôpital Laennec.

Retour sur le palier : ascenseur, vestiaires et lavabos.

Le *troisième étage* est occupé par les laboratoires de chimie et chimiothérapie de la tuberculose et d'anatomie pathologique.

Il est divisé en deux parties. La première comprend, de droite à gauche :

a) Une vaste salle pourvue d'une hotte centrale à aspiration, surmontant une longue table rectangulaire qui porte les appareils à évaporation et à concentration de la tuberculine, avec, tout autour, sous une grande cage vitrée à parois coulissantes, les autoclaves destinés à la stérilisation des cultures de tuberculose;

b) Une laverie;

c) Deux grandes chambres-étuves électriques, superposées, avec ascenseur spécial pour transporter à l'étage supérieur les cultures liquidesensemencées, de telle sorte qu'elles ne soient soumises à aucun ébranlement susceptible de noyer les voiles;

d) Un laboratoire d'ensemencement, immédiatement contigu aux deux chambres-étuves;

e) Un grand laboratoire affecté à la préparation de l'antigène méthylique de Boquet et Nègre;

La seconde partie de ce troisième étage, séparée de la première par une porte vitrée, comprend, de gauche à droite :

a) Deux grands laboratoires de chimie, de chimiothérapie et de chimie physique avec un laboratoire pour le chef (M. Machebœuf, chef de laboratoire; assistants : M. Sangor, M<sup>me</sup> G. Lévy, M. Delage), une chambre noire pour les appareils d'optique et une petite salle-atelier pour les réparations d'instruments, les centrifuges et le frigorifique;

b) Deux laboratoires d'anatomo-pathologie de la tuberculose



avec vitrines pour la conservation des pièces documentaires et des coupes (Anatomo-pathologistes : D<sup>r</sup> Coulaud, M<sup>lle</sup> Duboc).

Au-dessus du troisième étage, une vaste plate-forme recouvre tout l'édifice. Elle porte sur toute sa longueur un abri pour les ventilateurs-aspirateurs de l'air des laboratoires et des vapeurs des hottes. Elle découvre une vue magnifique sur toute l'agglomération parisienne et les environs (Mont-Valérien, coteaux de Saint-Cloud, de Meudon, etc.).

Redescendons maintenant par le grand escalier, jusqu'à l'entresol et au rez-de-chaussée qui sont tous deux éclairés, à droite par une courette anglaise en bordure de la rue Falguière, et à gauche directement sur les jardins de l'Institut Pasteur, ouverts sur la rue Dutot.

L'entresol comprend, à droite :

a) Deux salles d'autopsie, l'une pour les tuberculoses virulentes, avec appareil de réfrigération pour les cadavres de lapins et de cobayes; l'autre pour le BCG. Chacune de ces salles est pourvue de vitrines dans lesquelles sont conservés en bon ordre les instruments spéciaux qui leur sont affectés;

b) Une salle de radiologie expérimentale avec chambre noire et tout l'appareillage nécessaire à l'exploration, par la radioscopie ou à la radiographie, des petits animaux d'expériences, lapins, cobayes, singes.

A gauche, une vaste salle toute blanchie à la chaux, étendue sur la longueur et la largeur du bâtiment principal, divisée par des cloisons basses en ciment en deux séries de stalles à banquettes, également en ciment, supportant plusieurs centaines de cages, ou plutôt de caissettes cubiques, fermées par un couvercle grillagé, mobile, sans charnières. Ces caissettes, en tôle couverte de peinture d'aluminium, de 0 m. 40 de côté dans tous les sens, sont parfaitement stérilisables. Elles peuvent recevoir chacune 4 à 5 cobayes ou 2 lapins. Elles portent un numéro d'ordre et une étiquette mobile. La litière qu'on y utilise est la tourbe mousseuse. Celle-ci, une fois saturée d'excrétions, est brûlée dans un incinérateur.

Dans cette salle, à l'extrémité de laquelle est aménagé un compartiment pour la préparation des aliments des animaux, se trouvent des tables d'inoculation mobiles, en lave, portant

des balances pour la pesée, et, comme dans les services hospitaliers de chirurgie, un nécessaire roulant pour l'asepsie des champs opératoires et la désinfection des mains des opérateurs.

Même disposition au rez-de-chaussée, mais celui-ci est divisé en deux parties : l'une réservée au BCG (contrôle expérimental de la non-virulence des souches et expériences diverses); l'autre aux animaux neufs qui y pénètrent par une porte particulière s'ouvrant sur les jardins. Dans cette dernière partie, on a aménagé des boxes pour loger les moutons ou chèvres nécessaires aux travaux de sérologie, un box pour deux ou trois vaches et une stalle pour deux chevaux, en vue des recherches sur le contrôle des tuberculines ou sur l'obtention des anticorps tuberculeux.

Séparé par une cage d'escalier de secours, le bâtiment-usine s'accrole au bâtiment principal, avec une entrée pour le combustible et balance-bascule automatique, rue Falguière. L'entrée des salles de machines donne directement sur les jardins de l'Institut.

L'énergie force et lumière par courant continu 110 volts est produite par quatre moteurs à gaz, dont deux à quatre cylindres, chacun de 80 chevaux et deux à deux cylindres, chacun de 40 chevaux, commandant quatre génératrices Gramme.

Le chauffage central, la vapeur et l'eau chaude sont fournis par des chaudières spéciales alimentées au gaz.

Dans la salle des machines se trouve le tableau de distribution d'énergie force et lumière dans les divers laboratoires, avec tous les appareils de contrôle indispensables.

Les réductions de plans et les photographies jointes à cette note suffisent à montrer que le but poursuivi par l'Institut Pasteur est aussi exactement que possible réalisé par l'édification de ces nouveaux laboratoires. Ceux-ci constituent un instrument de travail pourvu de tous les perfectionnements suggérés par les progrès de la technique.

Les divers services et les laboratoires où l'on s'occupait de la préparation du BCG, des tuberculines et antigènes, ou de recherches sur les diverses tuberculoses, sont désormais groupés à côté les uns des autres, quoique distincts, et concentrés sous la même direction. C'est évidemment une condition excellente pour le rendement des travailleurs (1).

(1) Les photographies ci-jointes sont dues au service de microphotographie de l'Institut Pasteur.



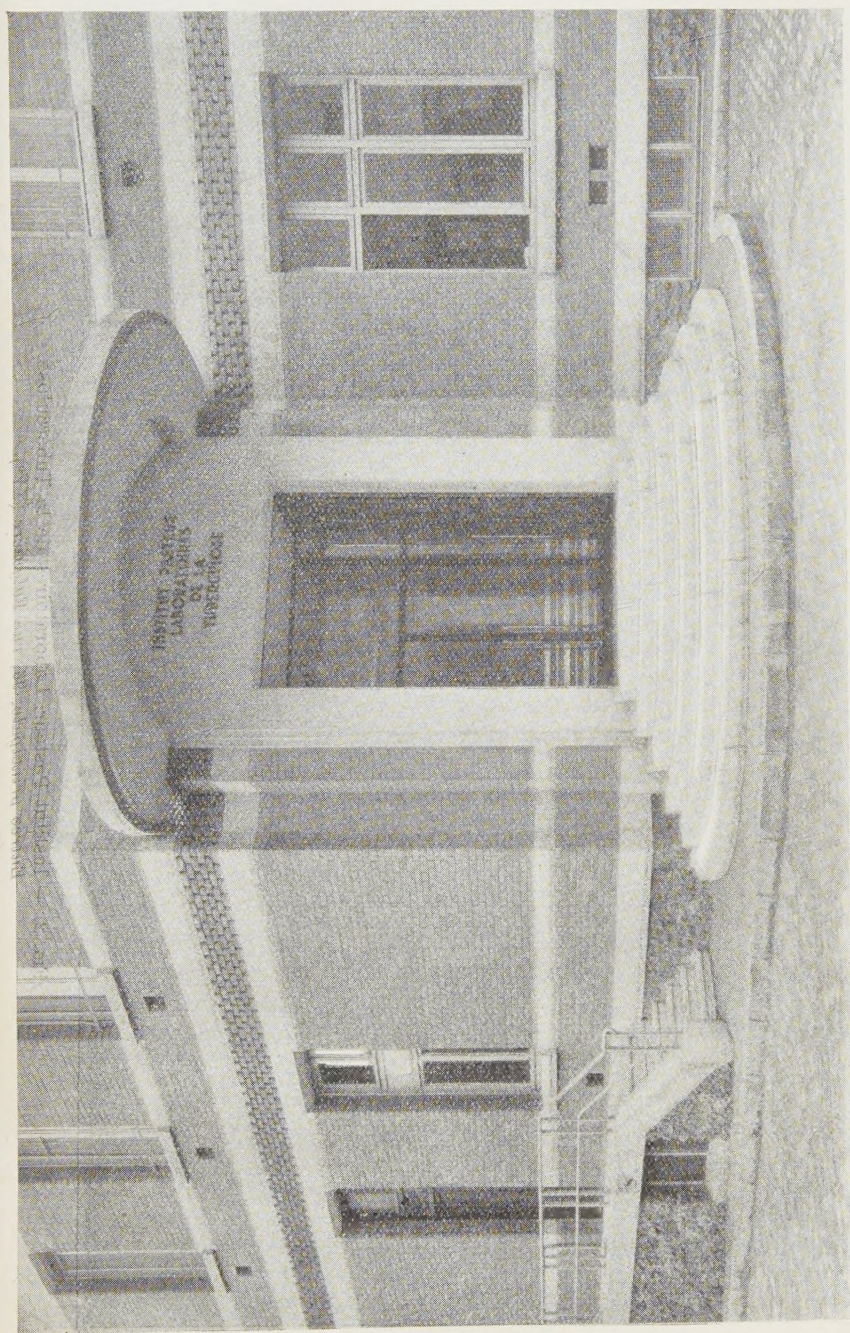


FIG. 1. — Institut Pasteur. Laboratoires de la Tuberculose.  
Entrée principale, 96, rue Falguière (XV).



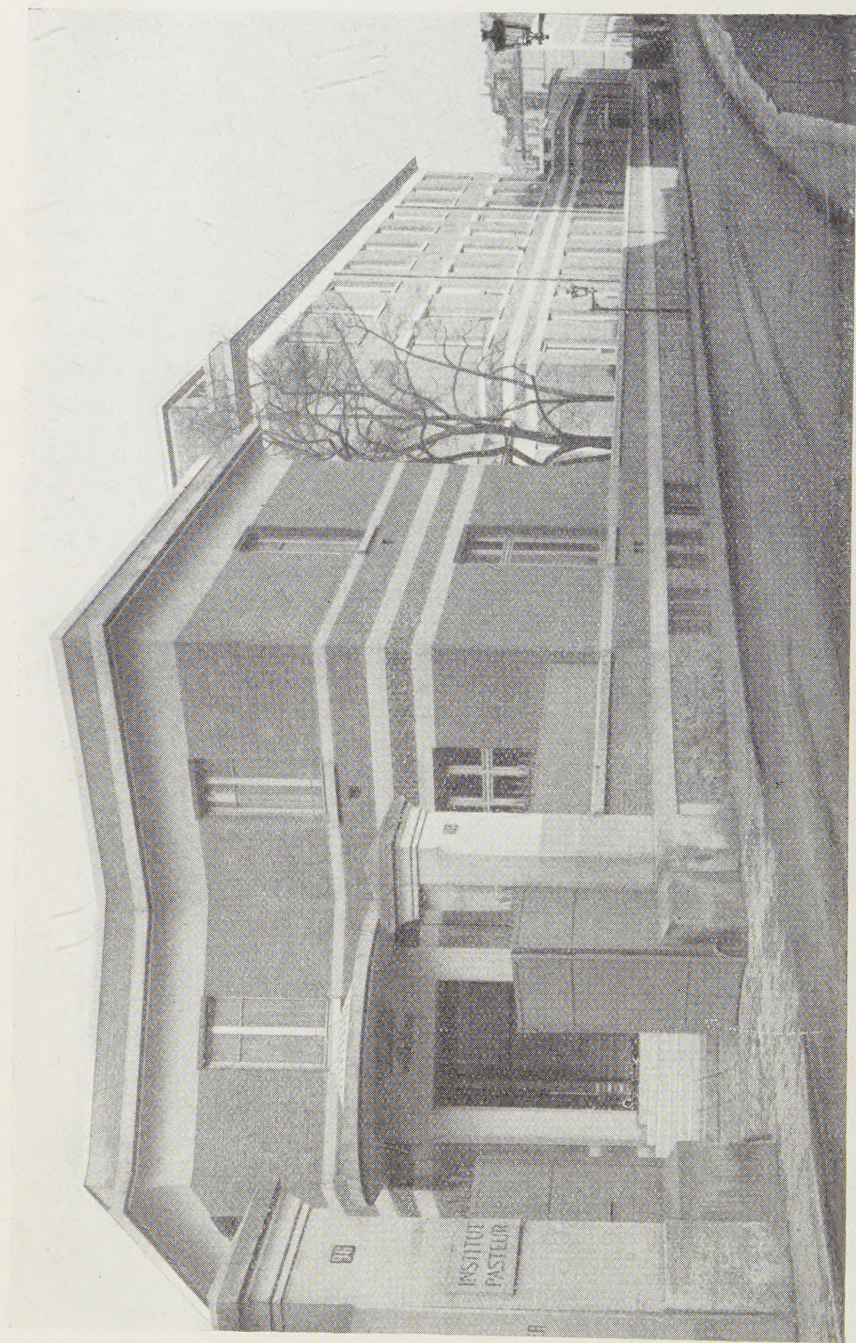


FIG. 2. — Institut Pasteur. Laboratoires de la Tuberculose.  
*Entrée principale, 96, rue Falguière (XV<sup>e</sup>).*



FIG. 3. — Institut Pasteur. Laboratoires de la Tuberculose.  
*Façade sur les jardins de l'Institut.*



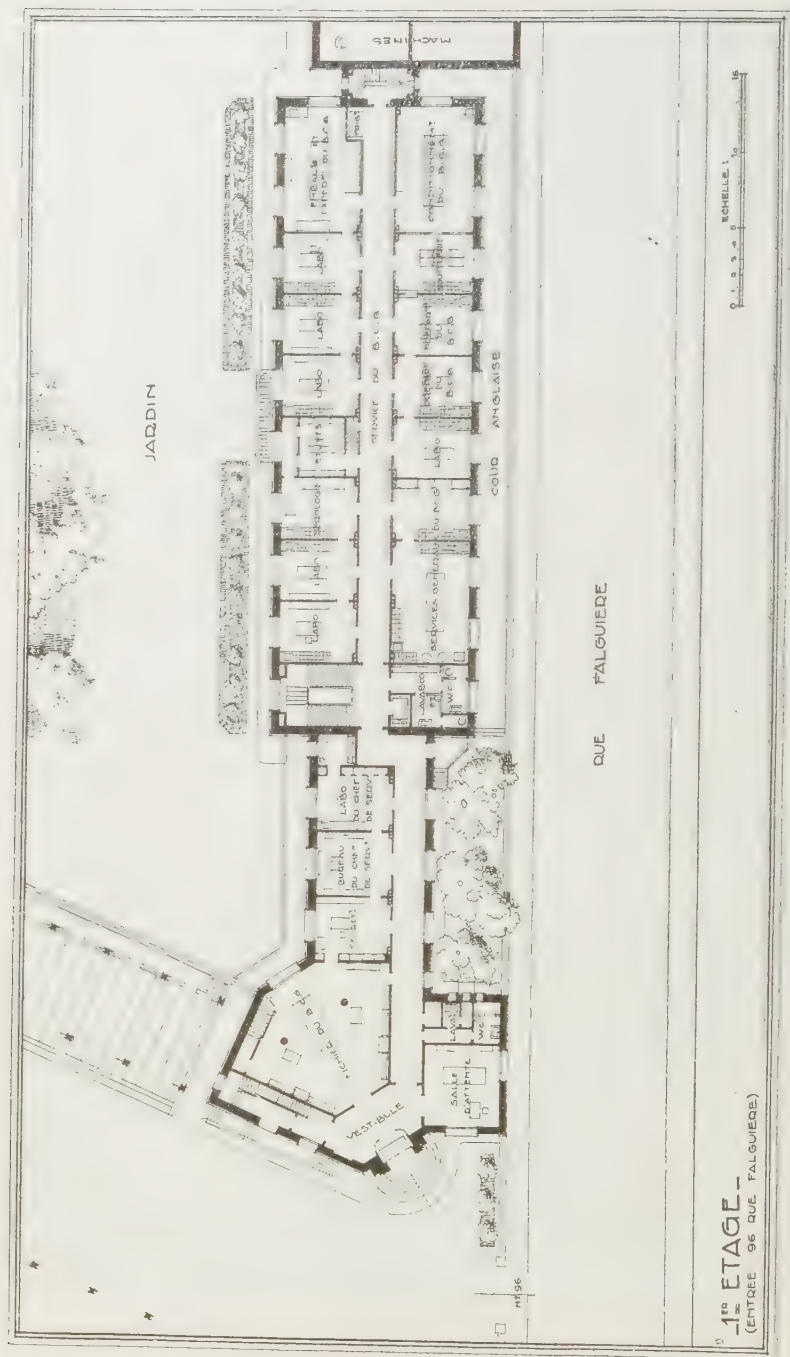


Fig. 4.





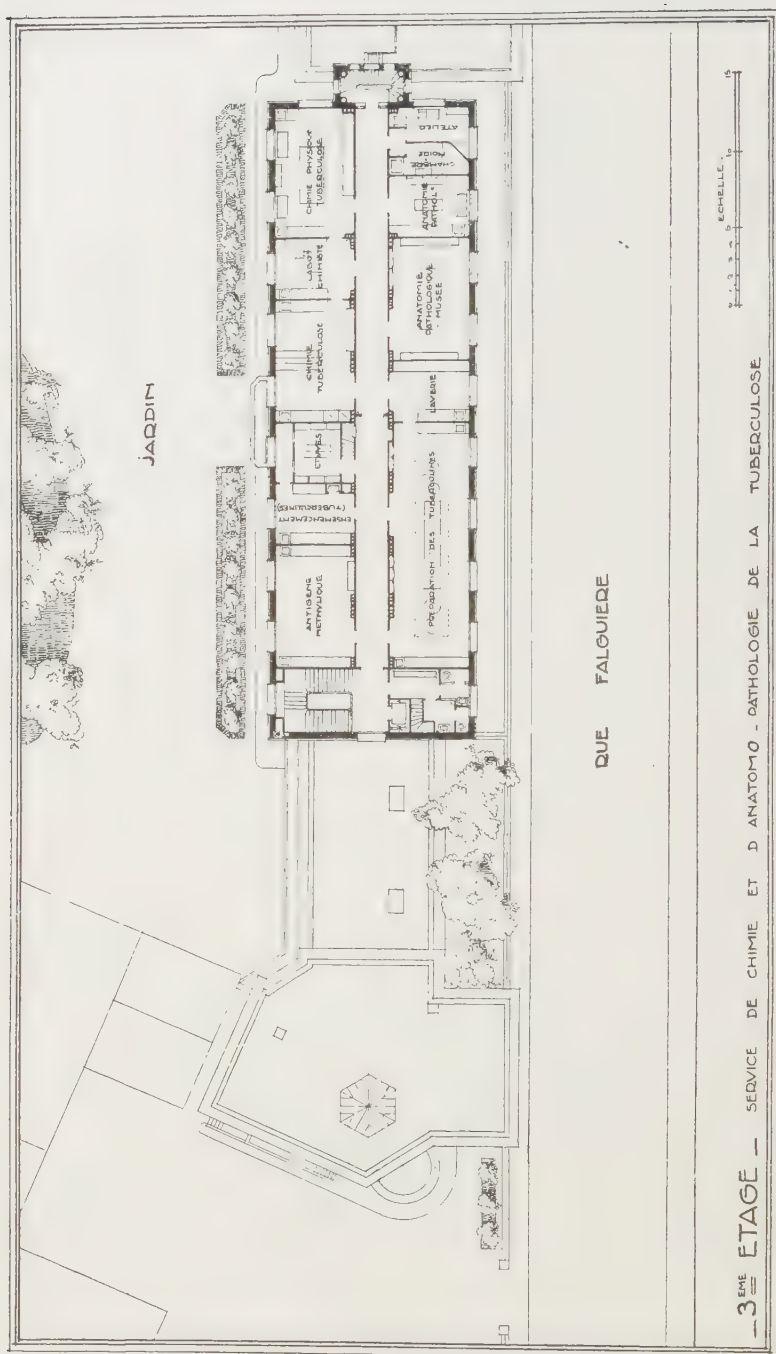


FIG. 6.

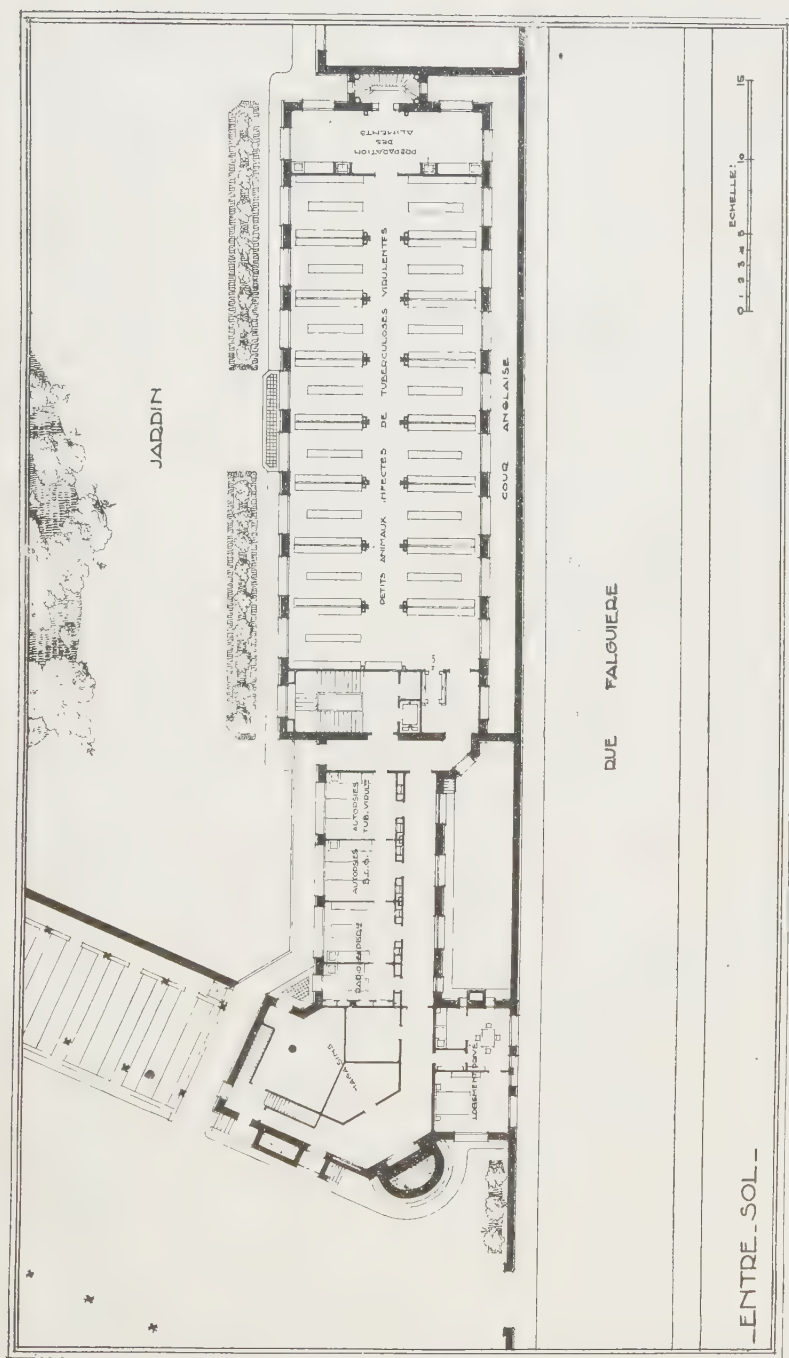


Fig. 7.

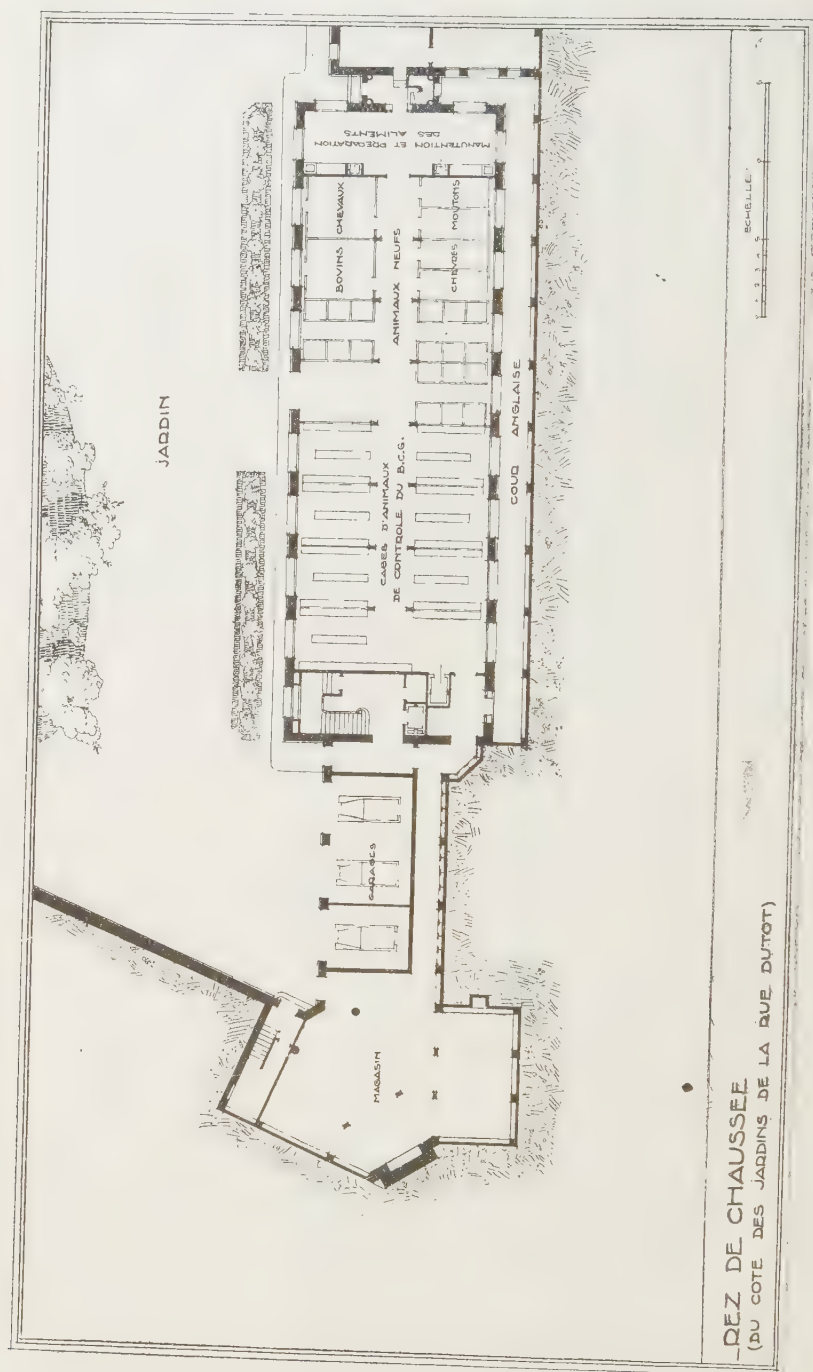


Fig. 8.



## LE PHÉNOMÈNE DE TWORT ET LA BACTÉRIOPHAGIE

par P.-C. FLU et E. RENAUX.

Dans la note qu'il a publiée récemment, M. d'Hérelle (1) demande à M. Gratia « *de désigner un bactériologue responsable, professeur d'Université, à qui il enseignera sa technique et qui en fera la démonstration au professeur P.-C. Flu, directeur de l'Institut d'Hygiène tropicale de l'Université de Leyde, qui m'a déclaré qu'il accepterait d'être mon représentant. Ces savants publieront les résultats obtenus, quels qu'ils soient* ».

M. Gratia a prié l'un de nous de prendre connaissance de sa technique et de se rendre à Leyde pour l'y exécuter conformément à la proposition de M. d'Hérelle.

Il s'agissait en l'occurrence de reproduire « *avec un bactériophage staphylococcique authentique, la matière vitreuse de Twort, constituée de fines granulations colorées en rougeâtre par le Giemsa, avec toutes ses caractéristiques, notamment sa stérilité, sa propagation, sa transmissibilité et non pas uniquement de cultures secondaires résistantes, comme le croit d'Hérelle* (2) ».

Nous publions ici les résultats des expériences faites en commun.

Nous avons utilisé un bactériophage antistaphylococcique (BLS) isolé par Gratia de la pulpe vaccinale du « Lederle antitoxin laboratory » à Pearl River U. S. A. et un staphylocoque blanc (4 a) isolé par Renaux, il y a cinq ans, de la vaccine de l'Office vaccinogène de l'État à Bruxelles. Ce staphylocoque, au cours des centaines de repiquages auxquels il a été soumis, n'a jamais montré ni transformation vitreuse ni tendance à la lyse spontanée.

Les expériences ont été pratiquées en suivant la technique

(1) Ces *Annales*, 47, n° 5, novembre 1931.

(2) Ces *Annales*. *Ibid.*

indiquée par Gratia, avec cette seule différence que, pour rendre ce matériel plus transportable, nous avons effectué nos essais, non plus en boîtes de Pétri, mais en tubes, sur gélose à 2 p. 100. L'un de nous avait apporté de Bruxelles de la gélose et du bouillon de même fabrication que ceux sur lesquels il avait effectué ses premiers essais; mais des épreuves complémentaires furent réalisées en utilisant le bouillon et la gélose de l'Institut de Médecine tropicale de Leyde.

Nous avons veillé à travailler toujours en milieu humide : il faut que chaque tube de gélose contienne environ 1/2 cent. cube d'eau de condensation. Au besoin on y ajoute quelques gouttes de bouillon. Les tubes sont capuchonnés de caoutchouc pour éviter toute évaporation.

Voici, énoncés brièvement, le détail et les résultats des expériences effectuées par nous :

1° Pour notre édification personnelle, nous avons voulu tout d'abord contrôler l'activité du bactériophage BLS : des tubes de bouillon sontensemencés de staphylocoques 4a. Après des temps variables de douze à vingt-quatre heures, lorsque la culture est bien trouble, on ajoute 5 gouttes de BLS et on remet au thermostat à 37°. La clarification survient complète après seize à quarante-huit heures. L'examen à l'éclairage sur fond noir montre à ce moment une énorme quantité de granulations très fines au milieu desquelles on croit distinguer de très rares staphylocoques.

2° Sans attendre la lyse de ces cultures, on fait au moyen de l'anse de platine des prélèvements quatre heures, sept heures et vingt-quatre heures après l'addition de BLS et on étale en strie sur gélose inclinée en guidant la gouttelette de haut en bas sur le milieu de culture.

Dans presque tous les cas, après trente-six à quarante-huit heures à 37°, on voit apparaître, à côté des colonies transparentes d'emblée, des colonies opaques au début mais qui bientôt présentent en un point quelconque de la périphérie une petite zone vitreuse. Celle-ci s'étend progressivement à une grande partie de la colonie et parfois même l'envahit complètement. *Il y a donc propagation.* Ultérieurement on voit apparaître parfois, à la périphérie de la zone vitreuse, de petites colonies de staphylocoques résistants.

3° Au moyen de l'anse de platine, on prélève un peu de ce matériel vitreux en ayant bien soin d'éviter de toucher la partie restée opaque de la colonie et les colonies résistantes éventuelles. On étale en traînée sur gélose. On porte à 37°. On n'observe pas de culture, même après quarante-huit heures. La substance vitreuse est donc *stérile*.

4° De chaque côté de cette traînée restée stérile, on *ensemence* du staphylocoque 4 *a* par touches légères et à des distances variant de 1 à 3 millimètres des bords de la strie. Lorsque la colonie ainsi formée se développe et qu'elle vient au contact du matériel vitreux étalé, elle subit elle-même la transformation vitreuse au point de contact, et cette transformation s'étend progressivement à toute la colonie. *Il y a donc transmissibilité*.

Le même résultat est obtenu en remplaçant la strie de substance vitreuse par une traînée de bactériophage BLS que l'on entoure de staphylocoque 4 *a*.

5° On transporte un peu de matériel vitreux sur des cultures de vingt à vingt-quatre heures de staphylocoque 4 *a* sur gélose. On y observe après vingt-quatre heures un développement lent de la formation vitreuse. Ces cultures trop âgées ne représentent pourtant pas le matériel de choix pour une telle épreuve.

6° Plusieurs expériences faites sur gélose et en bouillon préparés à Leyde donnent des résultats qui concordent avec ceux obtenus sur les milieux de culture apportés de Bruxelles. En général, elles sont cependant moins démonstratives: la gélose préparée à Leyde est trop concentrée (3 p. 100).

7° La substance vitreuse, examinée au microscope après coloration par la méthode de Gram et par la méthode de Pappenheim-Giemsa, se révèle Gram-négative et constituée essentiellement de fines granulations colorées en rougeâtre par le Giemsa. On y trouve parfois, disséminés, de rares staphylocoques résistants.

A l'éclairage sur fond noir, on retrouve les mêmes éléments: fines granulations et très rares staphylocoques.

*Remarque.* — Les essais pratiqués entièrement à Leyde ont donné des résultats plus caractéristiques que ceux commencés à Bruxelles par Renaux, puis transportés et continués à Leyde.

Gratia avait attiré déjà l'attention sur la difficulté de transporter ces expériences.

\* \*

En résumé : en faisant agir le bactériophage BLS sur le staphylocoque 4 *a*, nous avons réalisé le phénomène de Twort consistant en l'apparition, dans les colonies de staphylocoque, d'une substance vitreuse composée de fins granules colorés en rouge par le Giemsa. Cette substance se caractérise en outre par sa stérilité, sa propagation et sa transmissibilité.

[ *Institut d'Hygiène tropicale de l'Université de  
Leyde et Faculté de Médecine de l'Université de  
Bruxelles (1).* ]

(1) Le Dr E. RENAUX remercie le Fonds National de Recherche scientifique à Bruxelles qui a bien voulu s'intéresser à cette démonstration.



# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA LYSÉ DES CELLULES SANGUINES PAR LA STAPHYLOTOXINE

par O. GENGOU

(Laboratoire d'hygiène de l'Université de Bruxelles.)

On sait, depuis assez longtemps déjà, que certains staphylocoques sécrètent des substances capables d'exercer, soit *in vitro*, soit *in vivo*, des actions diverses. On a été de la sorte conduit à admettre l'existence, dans les filtrats des cultures staphylococciques, d'une toxine susceptible de tuer des animaux comme le lapin, d'une leucocidine capable de lyser les leucocytes de cet animal, d'une hémolysine qui dissout ses hématies.

Nous avons montré récemment [1] qu'en réalité ces diverses propriétés des filtrats staphylococciques, attribuées tout d'abord à des substances distinctes, sont en réalité dues à une seule et même matière. Si les activités de ces filtrats nous paraissent multiples, ce n'est pas parce que chacune d'elles est due à une substance spéciale, c'est parce que nous mettons ces liquides en contact de tests divers : animal, hématie, leucocyte.

Nous avons démontré dans la même note que le pouvoir lytique de ces filtrats s'exerce, *in vitro*, non seulement à l'égard des globules blancs ou rouges de lapin, ce que l'on savait depuis longtemps, mais aussi vis-à-vis d'autres cellules de cet animal : hémotoblastes, cellules des capsules surrénales, etc.

Dans un second travail [2], nous avons fait observer que cette toxine constitue non un produit de dégénérescence du microbe, mais une substance élaborée par ce dernier au cours même de son développement. Il résulte enfin, des recherches exposées dans la même note, que le poison staphylococcique ne peut être considéré comme un simple produit des cultures en milieu artificiel, mais que le germe le sécrète également dans l'organisme au cours des infections qu'il détermine.

La signification réelle de la staphylotoxine que renferment les cultures *in vitro* et son apparition au cours des infections étant ainsi établies, il nous a paru opportun de rechercher si la dissolution des cellules sanguines par ce produit est limitée à l'altération de la forme cellulaire, avec disparition plus ou moins totale de ces constituants morphologiques, ou si elle se poursuit jusque dans la destruction des substances auxquelles la cellule doit les propriétés que nous lui connaissons. Remarquons à ce propos que si l'on a mis en évidence depuis longtemps d'assez nombreux produits d'origine microbienne, animale ou végétale, capables de lyser certaines cellules animales, et particulièrement les hématies, il ne semble pas que l'on ait recherché jusqu'ici si les substances actives de ces cellules disparaissent également au cours de la lyse de ces dernières.

En raison de son pouvoir lytique vis-à-vis des différentes cellules sanguines du lapin (hématies, leucocytes, hémato-blastes), la staphylotoxine nous a paru particulièrement propice à cette recherche. Certaines des propriétés de ces cellules sont dues en effet à des substances susceptibles d'en être extraites et conséquemment d'être soumises à l'action d'agents lytiques, tels que la staphylotoxine. Les expériences que nous avons entreprises à ce sujet sur certaines d'entre elles nous ont donné les résultats suivants :

I. — ACTION DE LA STAPHYLOTOXINE  
SUR LES SUBSTANCES LEUCOCYTAIRES DONNANT LIEU  
A LA TRANSFORMATION INTRACELLULAIRE  
DU VIBRION CHOLÉRIQUE EN GRANULE (PHÉNOMÈNE DE PFEIFFER).

Nous avons montré il y a quelques années [3] qu'on peut extraire, par une solution centinormale d'acide chlorhydrique, les substances des leucocytes de lapin, auxquelles ces cellules doivent le pouvoir de transformer en granules le vibrion cholérique. Neutralisé par un alcali, après élimination des globules blancs, l'extrait est en effet capable de produire, à très petite dose, cette transformation *in vitro*.

Mélangions à 0 c. c. 4 d'un extrait obtenu suivant la technique décrite dans le mémoire précité [3] des doses de staphylotoxine variant de 0 c. c. 1 à 0 c. c. 3. Malgré un contact

prolongé à 37°, les vibrons cholériques (0 c. c. 1 d'une émulsion d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose dans 50 c. c. d'eau physiologique) ultérieurement introduits dans ces mélanges se transforment complètement en granules, aussi bien que dans les mélanges où la staphylotoxine a été remplacée, soit par de l'eau physiologique, soit par la staphylotoxine inactivée par chauffage à 100° pendant trente minutes.

II. — ACTION DE LA STAPHYLOTOXINE  
SUR LE POUVOIR BACTÉRICIDE DU SÉRUM DE LAPIN  
A L'ÉGARD DU BACILLUS ANTHRACIS,  
POUVOIR BACTÉRICIDE D'UN A DES SUBSTANCES  
PROVENANT DES CELLULES BLANCHES DU SANG.

Dans un travail déjà fort ancien [4], nous avons signalé que le pouvoir bactéricide du sérum de lapin et du sérum du rat à l'égard du *Bacillus anthracis*, décrit autrefois par Behring, Sawtchenko, etc., n'existe pas dans le plasma de ces animaux. Si l'on recueille du sang de lapin dans un tube contenant de l'oxalate de potassium et si on en centrifuge une partie de manière à en récolter le plasma, on peut, par addition ultérieure de chlorure calcique, obtenir deux sérums: l'un (A) provenant du sang non centrifugé, l'autre (B) fourni par le plasma décanté du tube centrifugé et privé de cellules sanguines. Or, le sérum A est très bactéricide pour la bactériémie charbonneuse, tandis que le sérum B est dépourvu de ce pouvoir.

Gruber et Futaki ont démontré ultérieurement (1907) que ce pouvoir bactéricide du sérum de lapin et du sérum de rat est dû à des substances provenant des leucocytes et des hémotoblastes et mises en liberté au moment de la coagulation du sang.

Or, il est aisé d'obtenir, au cours d'une même saignée, d'une part du plasma oxalaté riche en hémotoblastes, de l'autre du plasma oxalaté ne contenant pour ainsi dire plus de cellules. Il suffit, pour se procurer le premier, de centrifuger doucement le sang oxalaté de façon à éliminer hématies et leucocytes, et, pour le second, de procéder à une centrifugation énergique et prolongée. L'addition de chlorure calcique à chacun de ces deux plasmas permet de recueillir, d'une part du sérum A produit en présence de plaquettes sanguines et

bactéricide pour la bactériidie charbonneuse, de l'autre du sérum B formé en l'absence de plaquettes et entièrement dénué de ce pouvoir.

Il nous est donc loisible, possédant deux échantillons A et B (respectivement riche en plaquettes, et privé de plaquettes) de plasma oxalaté du même lapin, d'y introduire, avant l'addition de sel calcique, une certaine quantité de staphylotoxine préalablement oxalatée à 1 p. 1.000. Après deux à trois heures de séjour à 37°, la lyse des plaquettes s'est produite dans les tubes de plasma A conformément à nos constatations antérieures [4]. On peut s'en convaincre en comparant ces tubes à un mélange, fait en même temps que le premier, du même plasma A et de staphylotoxine inactivée par chauffage à 100°. Dans ce dernier mélange, en effet, les plaquettes sont demeurées intactes et le liquide a conservé son trouble initial.

Si nous ajoutons ensuite à ces deux mélanges la quantité de chlorure calcique nécessaire à leur coagulation, nous obtenons deux sérums (A et A') formés, le premier aux dépens du plasma contenant les plaquettes lysées par la staphylotoxine, le second aux dépens du plasma renfermant les plaquettes intactes.

Ajoutons, à 0 c. c. 4 de chacun de ces sérums, des quantités variables (de 0 c. c. 02 à 0 c. c. 2) d'une émulsion dans 10 cent. cubes de sérum physiologique d'une culture de vingt-quatre heures de charbon bactériidien sur gélose. Les deux sérums manifestent à l'égard de la bactériidie la même propriété bactéricide.

Au contraire, le plasma B (sans plaquettes), additionné avant coagulation, soit de staphylotoxine fraîche, soit de staphylotoxine inactivée par chauffage, fournit par coagulation, après addition du chlorure calcique, du sérum entièrement privé de tout pouvoir bactéricide à l'égard de la bactériidie charbonneuse.

### III. — ACTION DE LA STAPHYLOTOXINE SUR LES SUBSTANCES DES HÉMATOBLASTES QUI CONCOURENT À LA COAGULATION DU SANG.

Bordet et Delange [5] ont élucidé le rôle essentiel joué par les hématoblastes dans le processus de la coagulation du sang.

Ils ont prouvé que ces cellules concourent à la formation de la thrombine, par union de leur cytozyme au sérozyme contenu dans le plasma.

Faisant bouillir pendant quinze minutes en eau physiologique oxalatée à 1 p. 1.000 des hématoblastes de lapin débarrassés de plasma, ces auteurs ont obtenu un *extrait de plaquettes* contenant le cytozyme.

Soumettons un extrait semblable à l'action de staphylotoxine oxalatée à 1 p. 1.000. Mettons en contact pendant quatre à cinq heures, à 37°, des volumes d'extrait variant de 0 c. c. 1 à 0 c. c. 3 avec des quantités de staphylotoxine oscillant entre les mêmes limites, puis ajoutons-y du plasma oxalaté privé de cellules, ainsi que la dose de chlorure calcique nécessaire à la neutralisation de l'oxalate. La coagulation se produit dans ces mélanges avec la même rapidité que dans ceux qui, au lieu de staphylotoxine, contiennent une égale quantité de staphylotoxine inactivée par le chauffage.

L'expérience est plus démonstrative encore si on fait agir la staphylotoxine non sur un extrait de plaquettes, mais sur les plaquettes elles-mêmes. Il suffit, à cet effet, de mélanger le poison staphylococcique à du plasma de lapin, faiblement centrifugé et conséquemment riche en plaquettes.

Mettons en contact, pendant cinq heures, à 37°, une quantité déterminée de staphylotoxine (0 c. c. 3) avec des volumes de plasma de lapin toujours identiques, mais renfermant des doses décroissantes de plaquettes (Il suffit, à cet effet, de mélanger en proportions variées du plasma peu centrifugé et contenant des plaquettes à du plasma longuement centrifugé et privé de cellules). Dans ces mélanges de plasma et de toxine, les plaquettes se lysent après une à deux heures et l'éclaircissement du liquide est des plus nets. Ajoutons, après cinq heures de contact, un volume fixe d'eau physiologique oxalatée, et enfin la quantité de sel calcique nécessaire à la neutralisation de l'oxalate. La coagulation se produit dans chacun des tubes, dans le même délai que dans les mélanges analogues où, au lieu de staphylotoxine fraîche, on a introduit un volume correspondant de staphylotoxine préalablement oxalatée et inactivée par la chaleur.



#### IV. — ACTION DE LA STAPHYLOTOXINE SUR LE CYTOZYME DES HÉMATIES.

Il y a quelques années, Bordet et Renaux [6] ont attiré l'attention sur le cytozyme des hématies et ils ont décrit la technique de son extraction. Mélangés à du plasma privé de cellules et conséquemment de cytozyme, les extraits obtenus par cette technique déterminent la coagulation du plasma, par suite de la formation de thrombine consécutive à l'union de leur cytozyme au sérozyme du plasma.

Nous avons observé que, de même, l'addition à du plasma très pauvre en hémato blasts, d'hématies de lapin abondamment lavées et en suspension dans l'eau physiologique oxalatée à 1 p. 1.000, accélère notablement la coagulation. Dès que le mélange est additionné de chlorure calcique en quantité suffisante pour neutraliser l'oxalate, le sérozyme du plasma, qui ne trouve dans ce dernier que des traces de cytozyme, en rencontre au contraire en abondance dans les hématies et s'y unit pour engendrer de la thrombine. Cette accélération de la coagulation, due à la présence d'hématies, est particulièrement nette quand on opère dans des récipients paraffinés.

Or si, avant d'être introduites dans le mélange, les hématies de lapin ont été au préalable complètement lysées par la staphylotoxine, l'accélération de la coagulation est encore plus marquée. Pour apprécier cette accélération, il faut d'abord préciser le temps nécessaire à la coagulation de mélanges contenant, non seulement du plasma oxalaté (0 c. c. 5) dilué d'eau physiologique oxalatée (0 c. c. 8), mais aussi de la staphylotoxine fraîche oxalatée ou de la staphylotoxine inactivée et oxalatée, en quantité égale (0 c. c. 3) à celle qui provoquera la lyse d'un volume déterminé d'hématies (0 c. c. 4). L'addition de staphylotoxine, fraîche ou chauffée, de même que le bouillon du reste, retarde en effet notablement la coagulation.

Au contraire, si l'on introduit dans le plasma oxalaté et dilué 0 c. c. 3 de staphylotoxine ayant lysé 0 c. c. 4 d'hématies, la coagulation est beaucoup plus rapide (12 fois environ).

Cette expérience montre donc que, sous l'influence de la lyse

des hématies par la staphylotoxine, la réaction entre le sérozyme du plasma et le cytozyme des globules rouges est grandement facilitée et la coagulation accélérée.

On pourrait être tenté d'en déduire que, lors de la lyse, les hématies abandonnent leur cytozyme au liquide où elles baignent. L'expérience semble prouver qu'il n'en est rien : en effet, au lieu d'introduire dans les mélanges de plasma oxalaté dilué d'eau physiologique oxalatée décrits ci-dessus de la staphylotoxine ayant dissous des hématies, séparons au préalable dans cette dernière, par la centrifugation, les stromas résultant de la lyse des hématies d'avec le liquide L, puis remettons ces stromas en suspension dans un même volume de staphylotoxine fraîche. Introduisons respectivement dans deux tubes contenant du plasma oxalaté dilué des quantités égales de stromas S et de liquide L. Après neutralisation de l'oxalate, la coagulation est notablement plus accélérée dans le mélange additionné de stromas S que dans le mélange contenant le liquide L.

Il semble donc que, tout au moins dans les conditions de l'expérience ci-dessus, c'est-à-dire lors de la lyse des globules rouges par la staphylolysine en l'absence de calcium et de sérozyme, le cytozyme des hématies n'abandonne pas le stroma.

\*  
\* \*

Il nous paraît résulter de ces recherches que, lors de la lyse des cellules sanguines par la staphylotoxine, la disparition de la structure cellulaire ne s'accompagne pas de la destruction des substances auxquelles la cellule doit ses propriétés. C'est tout au moins le cas pour celles que nous avons soumises à l'expérience : *a*) la propriété des leucocytes de transformer en granule le vibrion cholérique après sa phagocytose ; *b*) le pouvoir des hématoblastes de conférer au sérum de lapin, lors de la coagulation, un pouvoir bactéricide intense à l'égard du *B. anthracis* ; *c*) la participation des hématoblastes à la coagulation du sang ; *d*) le pouvoir des globules rouges de remplir dans ce phénomène un rôle identique grâce à leur teneur en cytozyme.

Il ne peut évidemment être question de conclure de là qu'en

aucune circonstance la lyse d'éléments cellulaires par des poisons tels que les toxines microbiennes ne puisse jamais comporter, outre la destruction de la structure des cellules, celle des éléments auxquels celles-ci doivent certaines de leurs propriétés. Rien n'autorise actuellement pareille généralisation qui ne serait justifiée que si les recherches relatées ci-dessus étaient étendues à un nombre suffisant d'exemples du même ordre. Il est vraisemblable d'ailleurs que, lors de la lyse des cellules, le sort de leurs éléments constitutifs dépend aussi bien de la nature de ces éléments eux-mêmes que de la nature du facteur lytique.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] GENGOU, *Arch. internat. de Médec. expériment.*, **4**, 1930, p. 633.
- [2] GENGOU. *Ibid.*, **4**, p. 211.
- [3] GENGOU. *Bull. de l'Acad. de Méd. de Belgique*, 1920; *Ces Annales*, **35**, 1921, p. 497.
- [4] GENGOU. *Ces Annales*, 1901, p. 233.
- [5] BORDET et DELANGE. *Ces Annales*, 1912, p. 657, 737; *Ibid.*, 1913, p. 341. BORDET. *Ibid.*, **34**, 1920, p. 561.
- [6] BORDET et RENAUX. *Soc. de Biol.*, **95**, 1926, p. 887.

**ÉTUDE ÉTIOLOGIQUE ET PATHOGÉNIQUE  
DE LA MALADIE DE NICOLAS ET FAVRE  
LYMPHOGRANULOMATOSE INGUINALE SUBAIGUE,  
ULCÈRE VÉNÉRIEN ADÉNOGÈNE, PORADÉNOLYMPHITE)**

par C. LEVADITI, P. RAVAUT, P. LÉPINE et M<sup>lle</sup> R. SCHOEN

(PLANCHE IV)

**CHAPITRE PREMIER**

**GÉNÉRALITÉS**

Nicolas et Favre, dans une communication faite en collaboration avec Durand (1) à la séance du 31 janvier 1913 de la *Société médicale des Hôpitaux de Paris*, ont attiré l'attention sur une maladie particulière localisée dans les ganglions de l'aîne, et qu'ils ont dénommée : « *Lymphogranulomatose inguinale subaiguë d'origine génitale probable, peut-être vénérienne* ». La même année, leur élève Gaté (2) a consacré sa *Thèse* inaugurale au même sujet, et relaté les observations cliniques et les constatations microscopiques ayant autorisé les savants lyonnais à fixer le cadre nosologique de l'affection qui porte leur nom.

Il n'est pas dans notre intention d'entreprendre ici l'étude clinique de la lymphogranulomatose inguinale (*ulcère vénérien adénogène*), ni d'analyser les nombreux travaux se rapportant à l'étiologie, la pathogénie et l'histopathologie de cette affection. On trouvera ces indications dans la *Thèse* d'Adrien Phylactos (3),

(1) DURAND, NICOLAS et FAVRE. *Bulletins et Mémoires de la Société médicale des Hôpitaux de Paris*, 1913, séance du 31 janvier, 35, p. 274; *Lyon Chirurgical*, 9, 1<sup>er</sup> mai 1913, p. 561.

(2) GATÉ, Lymphogranulomatose inguinale subaiguë à foyers purulents intra-ganglionnaires d'origine génitale probable, peut-être vénérienne. *Thèse de Lyon*, n° 93, 26 juin 1913.

(3) PHYLACTOS, Lymphogranulomatose des ganglions inguinaux; ulcère vénérien adénogène. *Thèse de Lyon*, 1922.



travail remarquable fait sous la direction de Favre, où l'auteur insiste, entre autres, sur l'identité entre la poradénolymphite et le bubon climatique.

Nous désirons exposer dans le présent *Mémoire* nos recherches expérimentales commencées en octobre 1930, recherches inspirées par un important travail de Swen Hellerström et Erik Wassén (1) de Stockholm. Nos investigations, dont on lira plus loin les principaux résultats, concernent *la nature du virus qui provoque la lymphogranulomatosé inguinale, ses affinités, sa répartition dans l'organisme du singe, espèce animale éminemment réceptive, les altérations histopathologiques, le mécanisme pathogénique de la maladie humaine et expérimentale, l'immunité, les propriétés virulicides du sérum sanguin, etc.*

\*  
\* \*

Hellerström et Wassén, dans une note intitulée : « *Lésions de méningo-encéphalite chez les singes après inoculation intracérébrale de lymphogranulome inguinal* », présentée à la séance du 5 août 1930 du VII<sup>e</sup> Congrès international de Dermatologie et de Syphiligraphie (Copenhague), affirment ceci : lorsqu'on inocule à des *Macacus rhesus* et *cynomolgus* du suc de ganglions excisés chez des sujets atteints de la maladie de Nicolas et Favre, on obtient des altérations névraxiqnes « provoquées par l'agent pathogène de lymphogranulomatosé inguinale ». Le matériel d'inoculation provenait de cinq cas d'adénite datant d'environ trois semaines. Les résultats ont été constamment positifs. Voici, sommairement, la description qu'Hellerström et Wassén donnent de l'évolution clinique et de l'anatomie pathologique de la maladie expérimentale :

Après une incubation de six à douze jours, les singes montrent de la somnolence, de l'asthénie, des troubles de déséquilibre et, dans certains cas, de la raideur et des convulsions cloniques. La mort survient après six, quatorze ou vingt-sept jours, mais quelques sujets survivent. Les altérations ont pour siège la cor-

(1) HELLERSTRÖM et WASSÉN. VII<sup>e</sup> Congrès international de dermatologie et de syphiligraphie, Copenhague, 5-9 août 1930. Depuis la publication de ce travail, les auteurs suédois ont communiqué deux autres notes à l'Administration médicale et l'Institut Carolin de Stockholm (26 août 1931). Nous citerons ces nouvelles recherches au cours de ce Mémoire.

litalité cérébrale, en particulier les méninges. Elles consistent en une infiltration par des cellules endothéliales et des éléments plasmatiques. Ça et là on observe des manchons périvasculaires et une accumulation de leucocytes polynucléaires caryolysés. La maladie peut être transmise par des passages intracérébraux, et aussi par inoculation préputiale, auquel cas on observe une adénite des ganglions satellites. Ce qui prouve, d'après les savants suédois, qu'il s'agit, en l'occurrence, d'une infection du système nerveux et des voies lymphatiques, provoquée par le virus spécifique de la maladie de Nicolas et Favre, ce sont, d'abord, *l'identité entre l'aspect des lésions constatées chez le singe et chez l'homme*, ensuite *le fait que l'antigène préparé avec les centres nerveux, le liquide céphalo-rachidien et les ganglions des simiens infectés, fournit une réaction de Frei* (1) *positive chez l'homme atteint de lymphogranulomatose*. Ni l'examen direct, ni les cultures ne révèlent des germes visibles dans le névraxe des singes. Par ailleurs, les auteurs constatent l'absence de tous rapports entre la maladie provoquée expérimentalement, et les *encéphalites herpétiques* [Levaditi et Lépine] (2) ou *neurovaccinale* [Levaditi et Nicolau] (3).

Nos recherches ont été réalisées en connexion avec MM. Hellerström et Wassén, nos amis les professeurs Almqvist, Directeur de la *Clinique dermatologique de l'Institut Carolin*, et Kling, Directeur de l'*Institut bactériologique de l'Etat suédois*, nous ayant servi de trait d'union.

## CHAPITRE II

### NOS SOUCHES DE VIRUS

La plupart de nos souches de virus proviennent de malades hospitalisés dans le service de l'un de nous (Ravaut) à l'hôpital Saint-Louis; quelques-unes nous ont été fournies par notre

(1) Consulter au sujet de la réaction de Frei : FREI. *Klinische Woch.*, 8, 1992, p. 2038; HELLERSTRÖM. *Klin. Woch.*, 10, 1931, p. 595.

(2) LEVADITI et LÉPINE. *Acta Medica Scandinavica*, 71, 1929, p. 192.

(3) LEVADITI et NICOLAU. *Ces Annales*, 37, 1923, p. 1.

collègue le Dr Marcel Pinard, médecin-chef à l'hôpital Cochin. Voici les observations de ces malades :

OBSERVATION I. — *Kamm...* Cette observation a fait l'objet d'une communication de P. Ravaut, Rabeau et Didier-Hesse (1) à la *Société française de Dermatologie et de Syphiligraphie*. Il s'agit d'une jeune femme de vingt ans, qui entre à l'hôpital pour un bubon datant d'une quinzaine de jours. Elle a contracté, il y a dix-huit mois, une syphilis qu'elle n'a pas laissé soigner. Elle affirme ne s'être aperçue d'aucune ulcération génitale. A son entrée dans le service, l'examen le plus minutieux ne permet dè constater rien d'anormal au niveau de la vulve, du vagin ou de l'anus.

Le bubon est situé dans l'aîne droite, un peu plus bas qu'une cicatrice inguinale infundibulaire, qui daterait de l'enfance, et qui ressemble aux cicatrices que laissent les tuberculoses ganglionnaires suppurées. Il existe un ganglion dans l'aîne gauche, gros comme une noix.

L'examen microscopique de la flore vulvaire montre des germes variés, parmi lesquels il est possible de distinguer le bacille de Ducrey. Le produit de grattage de la vulve est dilué dans de l'eau stérile et injecté en intra-épidermo-inoculation dans le bras droit. Une cuti-inoculation, selon le procédé classique, est pratiquée avec la même dilution (14 octobre).

Dès le lendemain, l'intra-épidermo-inoculation avait déterminé la formation d'une papule surmontée d'une pustulette. Le jour suivant, une pustule s'est développée, et l'examen microscopique y montre une grande abondance de bacilles de Ducrey. Le 17 octobre, soit trois jours après, la pustule, qui a creusé un peu, contient toujours du bacille de Ducrey, ainsi que des germes d'infection secondaire.

Le 18, malgré l'absence de toute thérapeutique locale ou générale, on ne constate plus la présence du bacille de Ducrey. De plus, la pustule est en voie de cicatrisation. Ce processus de réparation spontanée fut extrêmement rapide. Dès le 21, le point d'inoculation est parfaitement souple, non infiltré, et le 22 on peut considérer la cicatrisation comme pratiquement terminée.

Le 23 octobre, le bubon fut incisé sous anesthésie. Sa paroi fut grattée à la curette et le produit recueilli fut broyé et injecté en intra-épidermo-inoculation en deux endroits. On obtint ainsi deux papules, disparues en six jours. Aucun autre procédé ne permet de mettre en évidence le bacille de Ducrey dans ce bubon.

Le 28 octobre, un nouveau grattage de la région vulvaire, d'aspect toujours normal, fut pratiqué et le produit injecté de la même façon. Cette fois, le résultat fut totalement négatif : simple papule durant quarante-huit heures, bien qu'à l'examen direct la flore microbienne se fût montrée très abondante.

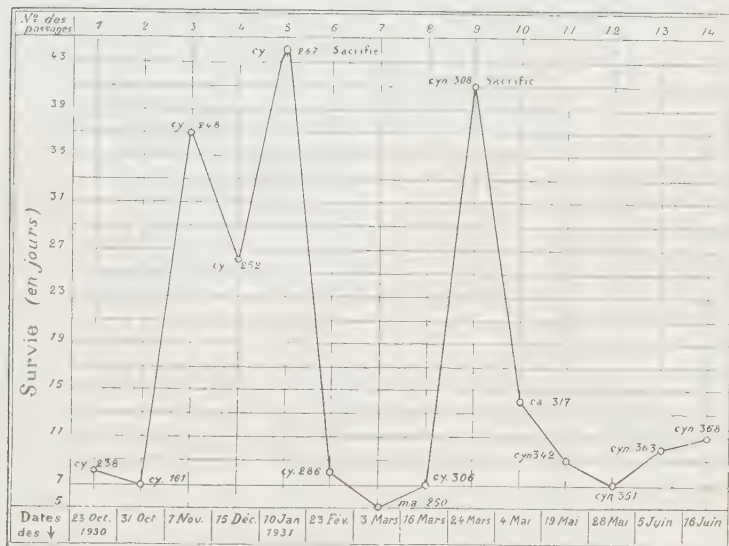
Il s'agit d'une adénopathie inguinale, ressemblant cliniquement à celle de la maladie de Nicolas et Favre, *avec présence du bacille de Ducrey dans la sécrétion vaginale de la malade (porteuse de germes)*.

(1) P. RAVAUT, RABEAU et DIDIER-HESSE. *Bull. de la Société française de Dermatologie et de Syphiligraphie*, 37, 1930, p. 1175.

Un ganglion inguinal est excisé le 23 octobre 1930; il sert à préparer une émulsion homogène, qui est inoculée, par voie intracérébrale, au *Macacus cynomolgus* 258. Le 29 octobre, soit le sixième jour, l'animal présente une parésie de la patte gauche postérieure et une incoordination des mouvements. Paralyse généralisée à la fin de la journée. Le 30 octobre, le singe est dans le même état. Il succombe le lendemain.

*Nécropsie* : cerveau et moelle très congestionnés, cultures du cerveau et du sang du cœur : stériles.

*Examen microscopique* : altérations intenses des méninges du cortex et des septums. Au centre, nombreux polynucléaires en partie caryolysés; à la péri-



COURBE 1. — Passages du virus lymphogranulomateux sur le singe (Inoculation intra-cérébrale). Souche Kamm...

phérie, des monocytes à noyaux ronds ou ovales et des cellules granulo-adipeuses. Certains vaisseaux de la corticalité sont entourés de manchons monocytaires. Ça et là, des plasmacytes. En général, œdème intense de la pie-mère et réseau de fibrine. Ces altérations se retrouvent au niveau de la protubérance et de la moelle épinière. Celle-ci offre une méningite à polynucléaires et à monocytes, et des lésions de névrite radulaire.

*Notre souche KAMM..., la plus virulente, et qui nous a permis de réaliser la plupart des expériences décrites dans ce MÉMOIRE, provient de ce cas. Cette souche s'est prêtée à des passages réguliers, actuellement au nombre de 20 (voir courbe 1).*

Obs. II. — *Grim...*, trente ans. A présenté il y a trois ans, dans l'aîne gauche, un ganglion un peu gros, non douloureux, qui a duré quinze jours et



disparu sans traitement. Il y a un an, petite écorchure de la verge, ayant persisté huit jours, sans adénopathie; elle a guéri spontanément, en laissant une cicatrice légère. Il y a un mois et demi, vers le 1<sup>er</sup> septembre, le malade a constaté l'apparition, dans l'aîne gauche, d'un ganglion qui a grossi assez vite. Le dernier rapport date de fin juillet, et aucune ulcération n'a été notée par la suite.

Le 18 octobre 1930, à l'entrée, on constate dans l'aîne gauche l'existence d'un ganglion du volume d'un œuf de poule; petits ganglions dans l'aîne opposée; pas de chancre ni de cicatrice de chancrelle. La ponction du ganglion donne issue non à du pus, mais à du tissu ganglionnaire ramolli, mêlé de sang. La cuti-inoculation du produit de la ponction au malade lui-même reste négative. L'intra-dermo-inoculation détermine, au bout de trois mois, la formation d'un nodule inflammatoire sécrétant une sérosité louche, dans laquelle on trouve des polynucléaires et des mononucléaires en abondance, mais pas de microbes, et notamment pas de bacilles de Ducrey.

Le 21 octobre, on pratique une réaction au Dmelcos, qui reste négative. Le 23 octobre, sous anesthésie, on incise le bubon et on pratique l'ablation du ganglion. Un fragment de ce ganglion est broyé et réinoculé au bras du malade, par voie intra-dermique. L'inoculation donne naissance, par la suite, à une lésion papuleuse à centre déprimé, dans laquelle on ne retrouve pas de bacille de Ducrey. Le reste du ganglion extirpé sert à préparer une émulsion qui est inoculée, par voie trans-cranienne, au *Macacus cynomolgus* n° 235. Le 29 octobre, soit le sixième jour, l'animal est agité, tremble, s'agrippe, en se raidissant au grillage de sa cage. Une véritable crise épileptiforme se déclare; elle s'accompagne de salivation. Le lendemain, l'état est le même, puis tout semble rentrer dans l'ordre, sauf la persistance de quelques tremblements des membres. Le singe est sacrifié le soixante-septième jour. Cultures du cerveau et du sang du cœur : *négatives*.

*Examen histologique.* Écorce antérieure : légère méningite corticale. Cette méningite, constituée par des mononucléaires et des lymphocytes, se retrouve au niveau de l'écorce postérieure et des noyaux centraux. La corne d'Ammon montre des altérations intéressant surtout les plexus choroïdes du ventricule latéral, où l'on décèle des formations lymphoïdes périvasculaires et une desquamation des cellules épendymaires. Moelle épinière : méningite à lymphocytes et à cellules plasmatiques, périnévrile radiculaire. Rares hémorragies autour des neurones de la substance grise.

Des fragments d'écorce cérébrale sont placés dans la glycérine et maintenus pendant vingt-quatre heures à la glacière. Ils sont repris et servent à préparer une émulsion homogène, qui est inoculée, par voie intra-cérébrale, au :

*Macacus cynomolgus* n° 258. — L'animal ne paraît pas malade. Il est sacrifié le vingt-quatrième jour. Son cerveau sert à inoculer, de la même manière, le *Macacus cynomolgus* n° 228, lequel survit indéfiniment.

L'examen du névraxe du *Cynomolgus* n° 258 ne montre aucune lésion.

*La souche isolée chez le malade GRIM... s'est donc révélée infiniment moins virulente que la souche KAMM... Elle n'a reproduit la maladie que lors de la primo-inoculation au singe, et ne s'est pas prêtée, par la suite, à des passages réguliers (voir schéma 2).*

Obs. III. — *Clauz...* Entre à l'hôpital le 25 novembre 1930. Bubon *sans porte d'entrée*, unilatéral gauche, d'aspect fibreux et multiganglionnaire, à type de maladie de Nicolas et Favre. Réactions biologiques :

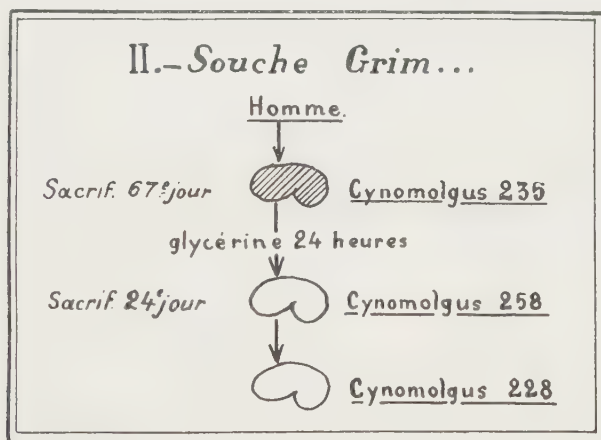
L'examen bactériologique du pus du bubon a montré de nombreux diplocoques, mais pas de Ducrey.

*Repiquage intra-dermique au bras* du pus du bubon (à deux reprises : 12 février et 16 mai 1931) : ulcération nette, creuse, suppurante. Dans ce pus, diplocoques nombreux, pas de Ducrey.

*Inoculation intra-dermique au cobaye* : ulcération creuse semblable, dont le pus, repiqué au bras du malade, a reproduit une deuxième ulcération analogue aux deux précédentes.

Evolution traînante, suppuration prolongée, guérison définitive en juin 1931.

Un ganglion inguinal est excisé le 26 novembre 1930. Il sert à préparer une



SCHEMA 2.

émulsion qui est inoculée, par voie intra-cérébrale et intra-ganglionnaire (ganglion de l'aîne) au :

*Macacus cynomolgus* n° 255. — Le 21 décembre, l'animal est maigre, se meut difficilement. Il montre une paralysie flasque de presque tous les muscles. Mort le 22 décembre, soit le *vingt-sixième jour*. Cerveau légèrement congestionné, cultures du cerveau et du sang du cœur : *négatives*.

*Examen microscopique*. *Écorce antérieure* : méningite corticale en foyer, méningite monocytaire des septums, manchons périvasculaires. *Ecorce postérieure* : méningite des septums, constituée par des lymphocytes, des cellules plasmatiques et de gros mononucléaires à protoplasme vacuolisé. Formation de petits lymphomes autour des vaisseaux et dans leurs parois. Lésions analogues dans les *noyaux centraux*, la *corne d'Ammon*, et surtout au niveau de la moelle épinière.

Le cerveau du *Cynomolgus* n° 255 sert à préparer une émulsion, qui est inoculée, par voie intra-cérébrale, au :

*Macacus cynomolgus* n° 246. — L'animal, en apparence bien portant, est

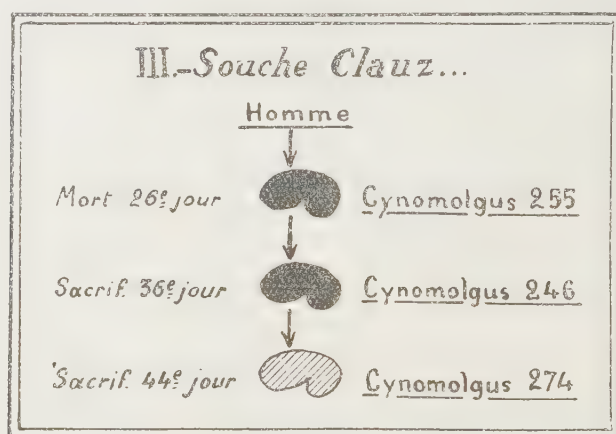
sacré le trente-sixième jour. Cultures du cerveau et du sang du cœur : stériles.

*Examen microscopique* : altérations intenses et caractéristiques de tout le névraxe.

Le cerveau du *Macacus cynomolgus* n° 246 sert à pratiquer un passage sur le *Macacus cynomolgus* n° 274. L'animal, qui ne présente aucun trouble morbide apparent, est sacrifié le quarante-quatrième jour.

*Examen histologique* : écorce postérieure. Légère réaction méningée et petits lymphomes périvasculaires. Ebauches de manchons autour des vaisseaux. Même altération dans les noyaux centraux et dans la corne d'Ammon. Aucune altération au niveau de la moelle épinière.

Ainsi, le virus isolé chez le malade CLAUZ... s'est révélé d'une activité pathogène plus accusée que celle de la souche précé-



SCHEMA 3.

dente, attendu que deux passages consécutifs ont pu être effectués avec succès. Néanmoins, sa virulence est loin d'égaler celle de la souche KAMM... (voir schéma 3).

Obs. IV (1). — Roust... Ce malade, âgé de vingt-quatre ans, entre dans le service le 20 novembre 1930, pour une ulcération minime de la verge, datant de un mois, et une adénopathie bilatérale apparue il y a quinze jours. Les derniers rapports datent de un mois et demi.

L'examen montre dans l'aine droite une tuméfaction du volume d'un œuf de poule, la peau qui la recouvre est rouge et chaude; on sent plusieurs zones de ramollissement. Du côté gauche, adénopathie de la taille d'un

(1) Cette observation et la précédente ont été publiées dans la thèse de M<sup>me</sup> Marie LAPORTE-DU BOUCHET. *Contrib. à l'étude du traitement des bubons inguinaux suppurés par l'électro-coagulation*, Paris, 1931.



marron, légèrement douloureuse. A la base du frein, il existe une ulcération absolument minime.

L'ultra-microscope ne montre pas de spirochètes, la réaction de Wassermann est négative. Tous les examens, faits à plusieurs reprises, dans le but d'identifier la nature du bubon, ont été négatifs.

Le 26 novembre, on fait une ablation au bistouri du ganglion gauche; le ganglion droit est électro-coagulé.

Le 3 décembre : chute de l'escarre. Le malade reçoit une première injection de Dmelcos (6 en tout). L'examen direct de la sérosité sécrétée par la plaie d'électro-coagulation montre des bacilles à centre clair, ressemblant au B. de Ducrey.

Le 15 décembre : l'état des deux plaies n'est pas semblable. La plaie d'électro-coagulation est plus grande et plus large, mais les bords sont à peine surélevés, le fond est plat, lisse, rouge, et la plaie se comble rapidement. Du côté gauche, la plaie d'incision est de dimensions beaucoup plus réduites, mais forme un véritable puits.

Le 17 janvier : Le malade sort complètement guéri. La cicatrice du côté coagulé est souple, linéaire, légèrement rosée. Il n'y a aucune rétraction. Par contre, du côté incisé, la cicatrice forme un léger bourrelet, avec induration au niveau de ses lèvres et à la périphérie.

Un ganglion inguinal, excisé le 26 novembre 1930, sert à préparer une émulsion qui est inoculée, par voie intra-cérébrale, au :

*Macacus cynomolgus* n° 254. — Le 28 décembre. L'animal paraît malade, a maigri, mais ne présente pas de paralysies. Le 31 du même mois, il se déplace avec difficulté. Mort le 2 janvier 1931, soit trente-sept jours après l'inoculation. Cultures du cerveau et du sang du cœur : stériles.

*Examen histologique* : altérations très intenses et caractéristiques de l'ensemble du système nerveux.

L'encéphale du singe est inoculé, par voie transcranienne, au *Macacus cynomolgus* n° 259. L'animal, en apparence bien portant, est sacrifié le trente et unième jour. Cultures du cerveau et du sang du cœur : stériles.

*Examen histologique* : altérations méningées de la corticalité et des septums, à disposition périvasculaire, riches en gros mononucléaires et en lymphocytes. Ces lésions se retrouvent dans les *noyaux centraux*, la *corne d'Ammon*, la *protubérance* et la *moelle épinière*.

Des fragments de névraxe de ce singe sont inoculés, sous forme d'émulsion, dans le cerveau du :

*Macacus cynomolgus* n° 224. L'animal, en apparence bien portant, est sacrifié le soixante-dixième jour. Le *liquide céphalo-rachidien*, limpide, contient 82 éléments (lymphocytes) par millimètre cube. A la nécropsie, on constate que la dure-mère est adhérente au point d'inoculation et à la base de l'encéphale. Cultures du cerveau et du sang du cœur : stériles.

*Examen microscopique* : *écorce antérieure*. Légère méningite monocytaire des septums et rares manchons périvasculaires à lymphocytes. *Ecorce postérieure* : mêmes altérations, moins accentuées.

Avec l'encéphale de ce singe, on effectue un passage sur le *Cynocephalus babuin* n° 271. L'animal est sacrifié le trente-septième jour.

*Examen histologique* : aucune lésion du névraxe.

*La souche Roust... s'est révélée d'une activité pathogène de moyenne intensité. En effet, elle a permis d'effectuer trois pas-*

*sages consécutifs, mais ces passages se sont arrêtés spontanément à la quatrième inoculation (voy. schéma 4).*

Obs. V (en collaboration avec M. Marcel Pinard). *Koust...*

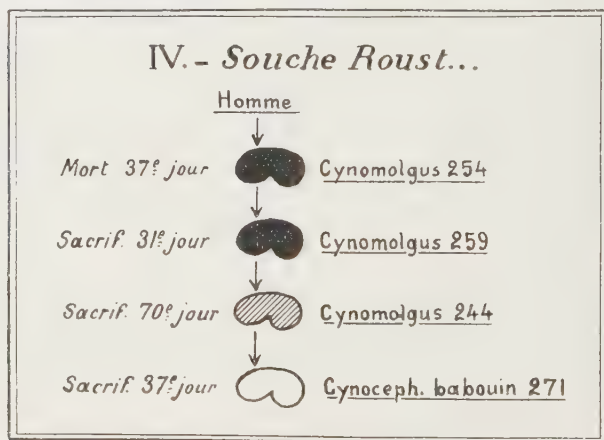
Le malade entre le 7 janvier 1931 pour une double tumeur inguinale. De chaque côté, grosse masse formée par plusieurs ganglions tuméfiés, soudés par la périadénite, douloureuse spontanément et à la mobilisation. Rapidement, les adénites prennent un caractère de suppuration collectée, avec augmentation des douleurs, rougeur de la peau, chaleur locale et fluctuation.

Prélèvement du pus pour inoculation, puis large incision et curetage. Absence de bacille de Ducrey dans les frottis faits avec ce pus.

Aucune porte d'entrée n'est retrouvée à ce bubon : pas de chancre mou ; intra-dermoréaction au Dmelcos négative.

Le malade dit avoir eu un chancre syphilitique il y a un an, pour lequel il est maintenant en traitement. Réaction de Hecht négative.

Après l'intervention, chancrellisation secondaire du bubon incisé. Alter-



SCHEMA 4.

natives de rétention et de suppuration, gros paquet de ganglions agglomérés dans l'aîne de chaque côté, parmi lesquels tantôt l'un, tantôt l'autre nécessite l'incision.

Une série de 6 injections de Dmelcos est pratiquée, ne paraissant pas avoir influencé l'évolution.

L'amélioration se manifeste aux environs du 15 février, six semaines après le début. Le malade reçoit alors 2 injections intraveineuses d'émétique, le 20 et le 22 février. Il sort le 23 février guéri, mais porteur de multiples cicatrices dans les aînes. Avant sa sortie, une seconde intra-dermoréaction au Dmelcos avait été pratiquée ; elle est restée négative.

Du pus ganglionnaire sert à inoculer, le 9 janvier 1931, par voie intra-cérébrale, le :

*Macacus cynomolgus* n° 265. L'animal n'a jamais présenté des troubles mor-

bides. Il est *sacrifié* le trente-quatrième jour. Cultures du cerveau et du sang du cœur : *stériles*.

*Examen histologique* : aucune altération au niveau de l'écorce antérieure. Dans les méninges de l'écorce postérieure et dans les noyaux centraux, des petits lymphomes autour des vaisseaux des *septums*. Légère méningite basale monocytaire de la corne d'Ammon.

En somme, *altérations légères, dénotant une virulence très atténuée de la souche Koust...* (voir schéma 5).

OBS. VI. — Cette observation a fait l'objet d'une note présentée par l'un de nous (Levaditi), en collaboration avec MM. M. Pinard et P. Robert, à la séance de mars 1931 de la Société française de Dermatologie et de Syphiligraphie (1). La voici, en résumé :

*Petr...* Le malade entre le 13 décembre pour un bubon siégeant dans l'aîne droite et formant une grosse masse des dimensions d'un œuf de poule, composée d'un gros ganglion entouré de plusieurs autres plus petits, soudés par la périadénite, dure et douloureuse à la palpation comme aussi à la marche, mais peu douloureuse spontanément dans le décubitus.

Il a été précédé par l'apparition, quinze jours plus tôt, d'une ulcération siégeant à la face interne du prépuce du côté gauche, à mi-distance du frein

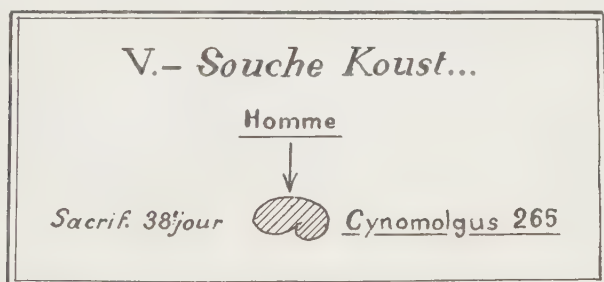


SCHÉMA 5.

et de la ligne médiane, exulcération très superficielle, souple, indolente et laissant sourdre un peu de sérosité.

La recherche du bacille de Ducrey y demeure négative; une intra-dermo-réaction au Dmelcos est également négative.

La recherche de la syphilis, pratiquée systématiquement, montre l'absence de tout signe de cette affection, sinon des fluctuations de la sérologie, comme on en voit après le Dmelcos et au cours de la maladie de Nicolas-Favre. Le malade avait, en effet, reçu, du 15 décembre au 4 janvier, des injections de Dmelcos, de même qu'une série de sulfarsénol.

Le 10 janvier 1931, du matériel prélevé au niveau de l'adénite inguinale est inoculé par voie transcranienne au :

(1) LEVADITI, PINARD et ROBERT. *Bull. de la Société française de Dermatologie et de Syphiligraphie*, 38, 1931, p. 455.

*Macacus cynomolgus* n° 266. Le singe ne présente pas de troubles nerveux et est sacrifié le 18 février, soit le quarantième jour. Cultures du cerveau et du sang du cœur : stériles.

*Examen histologique* : écorce antérieure. Lésions intenses de méningite monocytaire du cortex et des septums, avec formation de lymphomes périvasculaires. Mêmes altérations, mais plus accusées, au niveau de l'écorce postérieure, de la corne d'Ammon, de la protubérance et de la moelle épinière (manchons périvasculaires, foyers d'encéphalite).

Un passage est effectué sur le :

*Macacus inuus* n° 291 (virus conservé congelé pendant deux jours). L'animal est sacrifié le cinquante-quatrième jour. Aucune lésion microscopique et, cependant, le liquide céphalo-rachidien contient 240 lymphocytes par millimètre cube.

Un second passage, en partant du névraxe du singe précédent, réalisé sur

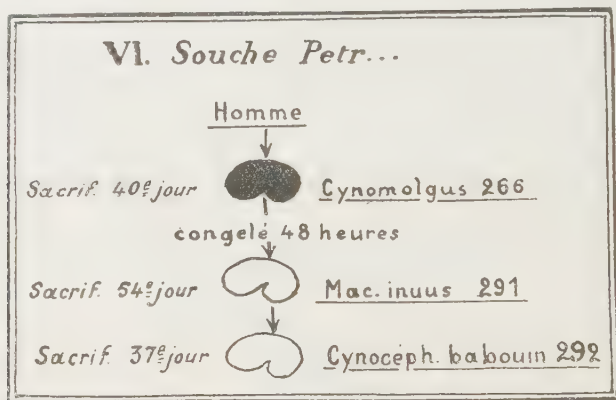


SCHÉMA 6.

le *Cynocephalus babouin* n° 292, fournit un résultat négatif (animal sacrifié le trente-septième jour).

*Il en résulte que la souche PETR... est peu pathogène pour le singe* (un seul passage a pu être réalisé) (voy. schéma 6).

OBS. VII, service de M. Marcel Pinard (hôpital Cochin).

*Coll... (Georges)*. Le malade entre le 24 avril, pour une adénite inguinale bilatérale qui a débuté par des phénomènes douloureux locaux au mois de février, d'abord à droite, puis à gauche deux jours plus tard. La tuméfaction reste stationnaire pendant environ six semaines, pendant lesquelles le malade consulte en ville, puis à l'hôpital Tenon, où trois prises de sang sont faites. La réaction de Wassermann est toujours négative, la première fois en février, la deuxième fois quinze jours plus tard, la troisième fois un mois après, et, enfin, une quatrième fois dans le service du professeur Delbet, où le malade entre avant de passer dans notre service.

A son entrée, on constate l'existence de trois tuméfactions en voie d'abcédation : deux à droite, au-dessus et au-dessous de l'arcade crurale, une à



gauche, où la tuméfaction est marquée, la peau rouge, chaude, peu douloureuse (à peine spontanément et un peu plus à la pression forte). En chacune de ces trois zones, la fluctuation indique la collection du pus.

Il n'existe aucune trace, ni aucun anamnestique de chancre.

Une incision peu étendue est pratiquée sur chacune de ces trois collections, le 25 avril. L'intra-dermoréaction au Dmelcos reste négative. L'intra-dermoréaction à l'antigène de ce même malade est positive.

Le malade reçoit une injection de glycérine quotidiennement, dans chacune des trois plaies. Le 14 mai, les plaies ont bon aspect, les suites opératoires ont été excellentes. Il y a un suintement de sérosité discret du côté droit, où l'on sent mieux les différents paquets ganglionnaires. Mais aucun résultat favorable n'intervient. Au contraire, le bubon s'est ramolli; rougeur et fluctuation montrent que le pus est collecté, et font intervenir. La plaie suppure pendant une dizaine de jours, au bout desquels la suppuration fait place à un écoulement de sérosité qui persiste encore une quinzaine de jours, après quoi la plaie se ferme complètement.

Le malade est suivi depuis ce temps et il conserve toujours une demi-douzaine de ganglions durs et indolents, roulant sous le doigt, dans l'aîne droite. De plus, il présente, au mois de février, une petite érosion sur le prépuce, au même endroit où siégeait précédemment le chancre primitif, lésion qui a un aspect comparable à celui d'une vésicule d'herpès ouverte. Cette lésion était encore présente à la date du 14 avril.

Le 17 mars, on lui fait une intra-dermoréaction à l'antigène de Frei, et le 20, on constate une réaction sous la forme d'une papule de dimensions d'une lentille rouge et surélevée, très nette depuis le 18, et qui est interprétée comme une réaction positive.

Le 14 avril, il reçoit une injection de 2 cent. cubes de glycérine dans la masse ganglionnaire, et, huit jours plus tard, une seconde injection pratiquée de la même manière. Ces deux injections ont hâté la diminution de volume de l'adénopathie, qui était restée stationnaire depuis la sortie du malade de l'hôpital.

Le 28 avril, nous inoculons du pus ganglionnaire au *Macacus inuus* n° 287. Le 4 mai, soit le sixième jour, l'animal est malade, tremble, se meut à peine. Le 20 mai, on note une parésie accompagnée d'amyotrophie du membre antérieur droit. Il conserve le même état jusqu'au 19 juin, date à laquelle il est sacrifié (cinquante-deux jours après l'inoculation). A la nécropsie, on constate une tuberculose pneumo-péritonéale. Cultures du cerveau et du sang : stériles.

*Examen histologique* : altérations caractéristiques, d'intensité moyenne.

Cette expérience démontre la présence du virus lymphogranulomateux dans le pus de l'adénite du malade COLL..., virus dont il nous a été impossible d'estimer l'activité pathogène, n'ayant pas pratiqué des passages avec cette souche.

Obs. VIII, service de M. M. Pinard, hôpital Cochin.

Dag... entre à l'hôpital le 7 juin 1931. Apparition de deux bubons de l'aîne. Aucune porte d'entrée apparente, pas de plaie, pas de chancre, intra-dermo au Dmelcos négative, auto-inoculations négatives, intra-dermo à l'antigène de Frei positive, sérologie négative (Hecht et Kahn).

Pas d'antécédents pathologiques.

L'examen somatique ne révèle aucun signe d'autre affection.

Le malade est traité par des injections, *in situ*, de glycérine.

Le 22 juin, on inocule du pus et une émulsion de fongosités ganglionnaires, par voie intra-cérébrale, au :

*Cynocephalus babuin* n° 382. L'animal ne présente aucun trouble morbide. Il est sacrifié le 25 juillet, soit trente-trois jours après l'inoculation. Cultures du cerveau et du sang du cœur : *négatives*.

*Examen histologique* : absence de toute lésion méningée ou névrauxique.

Il en résulte que, dans ce cas, *l'inoculation au singe a fourni un résultat totalement négatif*.

\* \* \*

Huit essais de transmission de la lymphogranulomatose inguinale au singe ont été réalisés; ils ont fourni sept résultats positifs, d'où il ressort que le *virus de la maladie de Nicolas et Favre est, pour ainsi dire, constamment présent dans les ganglions inguinaux, quels que soient les caractères et l'évolution cliniques de l'affection*. Toutefois, la virulence des diverses souches isolées est variable. A côté d'échantillons d'une activité pathogène très accusée, se prêtant à des passages en séries ininterrompues (*virus Kamm...* par exemple), il en existe d'autres dont la virulence est plus faible. Ceux-ci ne permettent qu'une ou deux inoculations successives, les passages s'arrêtant spontanément, sans que l'on puisse expliquer cet arrêt autrement que par l'atténuation du germe.

Une autre constatation importante se dégage de ces recherches : *la maladie expérimentale peut revêtir, chez le singe, l'aspect d'une « INFECTION INAPPARENTE »*. En effet, si certains animaux succombent, après avoir présenté des troubles morbides traduisant une irritation des méninges et la présence de lésions névrauxiques, d'autres, au contraire, n'offrent aucune symptomatologie. Or, sacrifiés après trente, quarante jours, ils se révèlent porteurs d'altérations microscopiques caractéristiques. De plus, leur système nerveux contient des quantités, souvent considérables, de germes, et se prête à des passages en série (souche *Kamm...*, par exemple).

Un problème se pose : *les ganglions inguinaux des sujets atteints de la maladie de Nicolas et Favre sont-ils les seuls à contenir le virus lymphogranulomateux?* En d'autres termes : existe-t-il une relation de spécificité entre cette maladie et le virus inoculable aux singes réceptifs? Afin de résoudre ce problème, nous avons pratiqué un certain nombre d'inoculations avec le pus collecté des ganglions suppurés d'*adénites chancrelleuses*. Nous résumons dans le Tableau I les résultats enregistrés.

Ce tableau montre que *toutes les inoculations de pus d'adénite chancrelleuse, au nombre de neuf, ont fourni des résultats négatifs, dans des conditions où des inoculations de suc de ganglions de sujets atteints de lymphogranulomatose inguinale auraient été couronnées de succès.*

TABLEAU I. — Inoculations de pus d'adénites chancrelleuses.

MALADE	SERVICE de	INOCULATION au singe	ANIMAL sacrifié le	RÉSULTATS (examen histologique) du névraxe)
X . . . . .	M. Pinard	<i>Cynomolgus</i> 243.	30 <sup>e</sup> jour.	Négatif.
Y . . . . .	M. Ravaut.	<i>Macacus inuus</i> 226.	44 <sup>e</sup> jour.	Négatif (passage négatif).
Dev. . . . .	M. Ravaut.	<i>Cynomolgus</i> 239.	44 <sup>e</sup> jour.	Négatif.
Berth. . . . .	M. Pinard.	<i>Cynomolgus</i> 264.	40 <sup>e</sup> jour.	Négatif.
Yali. . . . .	M. Pinard.	<i>Cynomolgus</i> 272.	59 <sup>e</sup> jour.	Négatif.
Borth. . . . .	M. Ravaut.	<i>Macacus inuus</i> 282.	54 <sup>e</sup> jour.	Négatif.
Loquat . . . . .	M. Ravaut.	<i>Macacus inuus</i> 278.	61 <sup>e</sup> jour.	Négatif.
Tray . . . . .	M. Ravaut.	<i>Cynocephalus babuin</i> .	38 <sup>e</sup> jour.	Négatif.
Coll. . . . .	M. Pinard.	<i>Cynocephalus babuin</i> .	47 <sup>e</sup> jour.	Négatif.

*Il en résulte que* LE VIRUS LYMPHOGRANULOMATEUX N'EXISTE QUE DANS LE TISSU LYMPHATIQUE DES MALADES ATTEINTS DE L'AFFECTION DE NICOLAS ET FAVRE. SON RÔLE ÉTIOLOGIQUE ET SES CARACTÈRES SPÉCIFIQUES SONT DONC HORS DE DOUTE.

## CHAPITRE III

## LE VIRUS LYMPHOGRANULOMATEUX

a) FILTRABILITÉ. — *Le virus lymphogranulomateux est un germe filtrable.* Ce caractère a été simultanément mis en évidence par nous-mêmes (1) et par Hellerström et Wassén (2). Voici le résumé de nos expériences :

EXPÉRIENCE I. — Emulsion cérébrale dans l'eau salée isotonique, provenant du *Cynomolgus* n° 252, mort le vingt-sixième jour (lésions positives). Filtration à travers une bougie Chamberland L<sub>3</sub>. Le filtrat est inoculé par voie intracérébrale et intrapéritonéale au *Cynomolgus* n° 263. L'animal est sacrifié le cinquante et unième jour. Lymphocytose rachidienne (237 lymphocytes par millimètre cube) et lésions manifestes, localisées principalement dans la substance blanche. L'émulsion non filtrée est injectée, par voie intracérébrale et intrapéritonéale, au *Macacus cynomolgus* n° 269. L'animal, bien portant en apparence, est sacrifié le cinquante et unième jour. L'examen microscopique révèle, chez lui, des altérations méningées et des manchons périvasculaires.

EXPÉRIENCE II. — Émulsion cérébrale du *Cynocephalus babuin* n° 318, sacrifié après une maladie typique, le onzième jour (altérations intenses). Cette émulsion, clarifiée par centrifugation, est filtrée à travers une bougie Berkefeld V. Le filtrat, stérile, est inoculé, par voie intracérébrale, au *Cynocephalus babuin* n° 329, le 15 mai 1931. Le onzième jour, l'animal présente, par intermittence, du nystagmus, est malade, titube et offre une hémiparésie gauche. Le lendemain, les pupilles sont dilatées. Le 30 mai, réactions pupillaires conservées, mais l'acuité visuelle paraît très diminuée. L'animal se heurte aux obstacles. Le 2 juin, mydriase avec réflexes photomoteurs presque nuls. Le singe se déplace avec précaution, steppant des membres antérieurs. Mort le 9 juin, soit le vingt-cinquième jour. Cultures du cerveau et du sang du cœur : stériles.

Examen microscopique : altérations méningées intenses et caractéristiques de l'ensemble du névraxe.

Ces deux essais montrent que *le virus lymphogranulomateux filtre à travers les bougies Chamberland L<sub>3</sub> et Berkefeld V.* Toutefois, *cette filtrabilité n'est pas constante.* En effet, dans plusieurs de nos essais (bougies Chamberland L<sub>3</sub> et L<sub>3</sub>), les résultats ont été négatifs. Il semble probable que *la filtrabilité*

(1) LEVADITI, RAVAUT, LÉPINE et M<sup>lle</sup> SCHOEN. *C. R. de la Société de Biologie*, 106, 1931, p. 729.

(2) HELLERSTRÖM et WASSÉN. *C. R. de la Société de Biologie*, 106, 1931, p. 729.



soit en rapport avec la concentration en germes de l'émulsion névrauxique, les souches les moins virulentes étant, précisément, celles qui fournissent des filtrats inactifs.

Ajoutons que les expériences de Hellerström et Wassén (*loc. cit.*) ont également démontré que le virus de la maladie de Nicolas et Favre traverse les filtres Berkefeld V et Chamberland L<sub>2</sub>.

b) RÉCEPTIVITÉ DES SIMIENS ET PASSAGES. — Notre souche *Kamm...* a subi, jusqu'à présent, vingt passages intracérébraux sur le singe. Ces passages sont continués. Le graphique (*cf.* graphique I, p. 31) montre, en partie, l'évolution de cette série ininterrompue d'inoculations de singe à singe. Les cas d'infection inapparente ayant nécessité le sacrifice de l'animal ont été au nombre de deux : les *Macacus cynomolgus* n° 267 et le *Cynocephalus babuin* n° 308. Les autres simiens sont morts après une période d'incubation et de maladie variant de cinq à trente sept jours, la majorité après huit jours (en moyenne).

Les espèces simiennes réceptives ont été : *Macacus cynomolgus*, *Macacus inuus*, *Cercocebus fulliginosus*, *Cercopithecus callithrix* et *Cynocephalus babuin*. Cette dernière espèce s'est révélée particulièrement sensible. Il nous a paru que la souche *Kamm...* a acquis une virulence plus accusée et plus constante, au fur et à mesure qu'elle s'est adaptée à l'organisme du *Cynocephalus babuin*.

Le *Macacus rhesus*, ainsi que l'ont déjà observé Hellerström et Wassén, semble moins réceptif à l'égard du virus lymphogranulomateux. Cependant, un de nos animaux a réagi par des lésions caractéristiques, quoique peu marquées, sans que son névraxe ait été virulent (passage négatif), ainsi qu'il résulte de l'expérience suivante :

EXPÉRIENCE III. — Virus provenant du *Macacus cynomolgus* n° 286, mort le huitième jour, avec des lésions intenses du système nerveux. Inoculation de ce virus au *Macarus rhesus* n° 304. L'animal, bien portant, est sacrifié le soixante-deuxième jour. Cultures du cerveau et du sang du cœur : stériles.

Examen microscopique : accumulation discrète de lymphocytes autour des vaisseaux des septums de l'écorce cérébrale; en profondeur, des manchons périvasculaires. Petits foyers lymphocytaires dans la protubérance. Au niveau de la moelle épinière, légère méningite et petits lymphomes le long des racines postérieures.

Un passage est effectué sur le *Cynocephalus babuin* n° 320. L'animal, bien portant, est sacrifié le cinquante et unième jour. Aucune altération du névraxe.

*La variabilité de la réceptivité individuelle des simiens, suivant l'espèce à laquelle on s'adresse, ressort de l'expérience suivante, où la même souche de virus a été simultanément inoculée, par la même voie intracérébrale, à plusieurs singes :*

EXPÉRIENCE IV. — Le 23 février 1931, on inocule le virus provenant du *Macacus cynomolgus* n° 267, sacrifié le quarante-quatrième jour et porteur de lésions névraïques intenses, à cinq singes d'espèce différente. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

TABLEAU II.

ESPÈCE de singe	NUMÉRO de l'animal	SORT de l'animal	LÉSIONS névraïques	PASSAGE
<i>Cynocephalus babuin</i> .	294	Mort le 5 <sup>e</sup> jour.	++++	-----
<i>Macacus rhesus</i> . . . .	295	Sacrifié le 35 <sup>e</sup> jour.	0	-----
<i>Macacus cynomolgus</i> . .	286	Mort le 8 <sup>e</sup> jour.	+++	Positif.
<i>Cercopithecus callithrix</i>	219	Mort le 32 <sup>e</sup> jour.	+++	-----
<i>Cercocebus fuliginosus</i> .	165	Mort le 8 <sup>e</sup> jour.	++++	-----

Cette expérience montre, d'abord, que le névraxe d'un animal atteint d'infection lymphogranulomateuse inapparente (le donneur 267) et sacrifié le quarante-quatrième jour, contient des quantités suffisantes de virus pour conférer au *Cynomolgus* une maladie mortelle, évoluant en huit jours. Ensuite, elle prouve l'inégale sensibilité des diverses espèces simiennes à l'égard d'une même souche de virus.

c) VIRULENCE POUR L'HOMME. — Le traitement de la paralysie générale par l'association d'infections pyrétogènes, malaria ou fièvre récurrente, est actuellement d'un usage courant. Toutefois, les échecs signalés dans certains cas réfractaires engagent à essayer l'application thérapeutique d'autres infections, dont celles déterminées par des virus neurotropes. Ayant entrepris l'étude de l'ultravirus provocateur de la lymphogranulomatose inguinale, et (ainsi que nous le verrons plus loin) démontré que ce virus ne se cantonne pas dans le système nerveux du

singe, mais se généralise dans l'ensemble de l'organisme, nous nous en sommes servi pour tenter la transmission de l'infection à un paralytique général. L'essai, entrepris dans un but thérapeutique, a été réalisé en collaboration avec M. A. Marie (1).

OBSERVATION. — N..., trente-cinq ans, paralysie générale offrant tous les symptômes classiques et sérologiques; agitation, démence prononcée, malariathérapie sans succès.

Le 5 juin, une émulsion cérébrale concentrée, provenant du *Cynocephalus babuin* n° 351, mort sept jours après l'inoculation transcranienne (douzième passage sur le singe de la souche Kamm...), est inoculée, par voie intradermique, à la face interne du prépuce du malade N... Rien de particulier pendant l'incubation, dont la durée a été d'environ trente-cinq jours. Pas d'accident initial visible.

Le 10 juillet 1931, on constate les modifications suivantes : adénopathie inguinale typique. A droite, quelques ganglions gros, tuméfiés, durs, déjà fixés en profondeur. A gauche : très grosse adénopathie dure de tous les ganglions de l'aîne soudés en masse, très fortement indurée, faisant sous la peau une saillie du volume d'un œuf. La palpation est indolore et n'arrive pas à séparer les ganglions les uns des autres. La peau n'est pas adhérente, ni enflammée. Rien à l'endroit de l'inoculation : ni accident primitif, ni trace visible de l'inoculation. Ganglions sous-axillaires non perceptibles.

En résumé : *éclosion d'une adénopathie inguinale bilatérale, mais plus accentuée à gauche, ayant apparu après une incubation de trente-cinq jours, et revêtant les caractères cliniques de la maladie de Nicolas et Favre, au début de son évolution.*

Nous poursuivons l'étude des effets thérapeutiques de l'infection surajoutée, et relaterons ultérieurement nos résultats. Pour l'instant, nos observations permettent de formuler les conclusions suivantes :

Conclusions : *le virus isolé des ganglions inguinaux d'un sujet atteint de lymphogranulomatose inguinale, entretenu sur le singe par des inoculations intracérébrales, et ayant subi douze passages sur cette espèce animale, conserve sa virulence pour l'homme. Inoculé par voie intradermique au prépuce d'un paralytique général, il provoque une adénopathie inguinale bilatérale, offrant l'aspect clinique et caractéristique de la maladie de Nicolas et Favre, au début de son évolution.*

(1) LEVADITI, MARIE et LÉPINE. C. R. de la Société de Biologie, 107, 1931, p. 1496.

d) INFLUENCE DU CHAUFFAGE (thermolabilité). — A quelle température le virus lymphogranulomateux perd-il son pouvoir pathogène? N'ayant pu réaliser des essais à des températures diverses, faute d'un nombre suffisant de singes, nous nous sommes contentés de chauffer le virus à 60°.

EXPÉRIENCE V. — Une émulsion cérébrale du *Macacus cynomolgus* n° 286. mort le troisième jour, est divisée en deux portions *a* et *b*. La portion *a* est chauffée trente minutes à 60°, puis inoculée, par voie intracérébrale, au *Cynocephalus babuin* n° 303, le 4 mars 1931. L'animal, bien portant, est sacrifié le soixante et unième jour. Cultures du cerveau et du sang du cœur : stériles.

*Examen histologique* : absence de toute lésion du névraxe.

La portion *b*, servant de témoin, est inoculée par la même voie au *Cynocephalus babuin* n° 302. Le 9 mars, soit le cinquième jour, l'animal est malade, tombe facilement et titube. Le lendemain, on note des crises épileptiformes typiques, survenant toutes les dix minutes environ. Le singe est très abattu dans l'intervalle des crises. Parésie du train supérieur. Mort le 11 mars. Culture du cerveau et du sang du cœur : négatives.

*Examen histologique* : altérations caractéristiques d'intensité moyenne.

Cette expérience montre que le virus lymphogranulomateux perd son activité pathogène pour le singe, s'il est chauffé pendant trente minutes à 60°.

e) ACTION DU FROID (1). — Nous avons étudié la durée de la conservation du virus lymphogranulomateux, lorsque les tissus qui le contiennent sont maintenus à des températures relativement basses. Des émulsions névrauxiques épaissies, préparées avec de l'eau salée isotonique, ont été placées dans une glacière, dont la température variait de — 2° à — 3°. Les essais de virulence ont été effectués à des intervalles variables (cf. tableau III).

Les données résumées dans ce tableau montrent que, soumis à l'influence du froid (— 2° à — 3°), le virus lymphogranulomateux conserve sa virulence pendant au moins dix jours (5 expériences avec 4 résultats positifs). Au delà de cette limite (quarante jours et plus), le germe paraît devenir apathogène. Vaccine-t-il? C'est ce que nous nous proposons d'étudier dans des recherches ultérieures.

Rappelons que, d'après les essais effectués par Hellerström et Wassén (août 1931, *loc. cit.*), le virus de la maladie de Nicolas et Favre, préalablement congelé, continue à être pathogène pour le singe au moins pendant vingt-deux jours.

(1) LEVADITI, RAVAUT, LÉPINE et M<sup>lle</sup> SCHOEN. C. R. Soc. de Biol., 107, 1931, p. 1525.



TABLEAU III. — Influence du froid.

SOURCE DU VIRUS	SORT DU DONNEUR	TEMPS de séjour à la glacière en jours	INOCULATION AU	RÉSULTATS
<i>Cynomolgus</i> 286	Mort le 8 <sup>e</sup> j.	2	<i>Cynocephalus babuin</i> 302.	Positif.
<i>Cynomolgus</i> 286	Mort le 8 <sup>e</sup> j.	2	<i>Macacus rhesus</i> 304.	Part. positif.
<i>Macacus inuus</i> 250.	Mort le 5 <sup>e</sup> j.	8	<i>Cynomolgus</i> 306.	Positif.
<i>Cynomolgus</i> 259	Sacrifié le 31 <sup>e</sup> j.	10	<i>Mac. inuus</i> 289.	Positif.
<i>Cynomolgus</i> 306	Mort le 7 <sup>e</sup> j.	40	<i>Cynocephalus babuin</i> 316.	Négatif.
<i>Macacus inuus</i> 250.	Mort le 5 <sup>e</sup> j.	55	<i>Cynocephalus babuin</i> 315.	Négatif.
<i>Cynomolgus</i> 286	Mort le 8 <sup>e</sup> j.	60	<i>Cynocephalus babuin</i> 314.	Négatif.
<i>Cynomolgus</i> 294	Mort le 5 <sup>e</sup> j.	63	<i>Cynocephalus babuin</i> 313.	Négatif.

f) ACTION DE LA GLYCÉRINE (1). — Contrairement à la plupart des ultravirus, en particulier ceux qui provoquent les *Ectodermoses neurotropes* (herpès, rage, poliomyélite, neurovaccin, etc.), le virus lymphogranulomateux ne se conserve pas longtemps si les fragments névrauxiques qui le renferment sont placés dans la glycérine pure (pH 5,8 à 6,2) à basse température (— 2°).

C'est ce qui résulte du tableau suivant :

TABLEAU IV. — Action de la glycérine.

SOURCE DU VIRUS	SORT DU DONNEUR	TEMPS de séjour dans la glycérine en jours	INOCULATION AU	RÉSULTATS
Souche humaine Kamm... (ganglion).	—	2	<i>Cynomolgus</i> 241.	Négatif.
Singe (virus suédois 481)	Mort.	9	<i>Cynomolgus</i> 242.	Négatif.
<i>Cynomolgus</i> 238	Mort le 8 <sup>e</sup> j.	13	<i>Cynomolgus</i> 241.	Négatif.
<i>Cynomolgus</i> 247	Sacrifié le 47 <sup>e</sup> j.	14	<i>Cynomolgus</i> 257.	Négatif.

Ces données, conformes aux premières observations de Hellerström et Wassén (*loc. cit.*), prouvent que le virus lymphogranulomateux ne se conserve pas longtemps dans la glycérine à basse température. Son activité pathogène s'atténue, ou disparaît totalement dès le neuvième jour (2), peu importe l'origine

(1) LEVADITI, RAVAUT, LÉPINE et M<sup>lle</sup> SCHOEN, C. R. Soc. de Biol., 107, 1931, p. 1525.

(2) HELLERSTRÖM et WASSÉN (août 1931, *loc. cit.*) ont pu conserver le virus actif dans la glycérine (pH 5) pendant sept jours.

de la souche, humaine ou animale. De ce point de vue, l'*agent étiologique de la maladie de Nicolas et Favre* semble s'écarter des *ultravirus neurotropes*, et se rapprocher du germe de la *fièvre jaune*. Ajoutons que cette action stérilisante de la glycérine a été utilisée par notre collègue Marcel Pinard dans le traitement des adénites lymphogranulomateuses (injection locale de glycérine), avec des résultats, semble-t-il, encourageants.

g) ACTION DE LA DESSICCATION. — La dessiccation paraît agir comme la glycérine. Contrairement à la majorité des *ultravirus*, celui de la maladie de Favre et Nicolas devient rapidement apathogène lorsqu'il est desséché dans le ride sulfurique à la température ordinaire. C'est ce qui résulte des données résumées dans le tableau suivant :

TABLEAU V. — Action de la dessiccation.

SOURCE DE VIRUS	SORT DU DONNEUR	TEMPS de conservation à l'état desséché en jours	INOCULATION AU	RÉSULTATS
<i>Cynomolgus</i> 246.	Sacrifié le 36 <sup>e</sup> j.	8	<i>Macacus inuus</i> 281.	Négatif.
<i>Cynomolgus</i> 259.	Sacrifié le 31 <sup>e</sup> j.	10	<i>Cynomolgus</i> 288.	Négatif (passage négatif).

Encore une dissemblance entre le virus lymphogranulomateux et les *ultravirus neurotropes*, lesquels, tout en s'atténuant, conservent pendant quelque temps leur virulence à l'état sec.

h) ACTION DES ANTISEPTIQUES. — Nous avons étudié l'action exercée *in vitro* par divers antiseptiques (tels le *formol*, l'*eau oxygénée*, l'*iode*) et par la *bile*. Nous résumons ci-dessous les résultats enregistrés :

1<sup>o</sup> *Formol*. Emulsion cérébrale du *Cynocephalus babuin* n° 363, mort le dixième jour, préalablement clarifiée par simple déposition. Cette émulsion est mélangée, à volumes égaux, avec une solution de formol à 1/500 (concentration finale 1/1.000). Contact pendant une heure quarante-cinq minutes à 37°; inoculation de 0 c.c. 8 dans le cerveau du :

*Cynocephalus babuin* n° 370. L'animal est sacrifié le vingt-troisième jour. Aucune lésion microscopique.

2° *Eau oxygénée*. Mélange *ad* de la même émulsion virulente et de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (12 volumes) à 1/50 (concentration finale 1/100). Le mélange, après une heure quarante-cinq minutes de séjour à 37°, est inoculé, à la dose de 0 c.c. 8, dans le cerveau du :

*Cynocephalus babuin* n° 371. Le dixième jour, l'animal présente une parésie du train postérieur, et le dix-huitième jour, une asthénie généralisée. Il est sacrifié le vingt-troisième jour.

*Examen microscopique* : altérations caractéristiques de tout le névraxe, d'intensité moyenne.

3° *Iode*. Une solution de Lugol, diluée à 1 p. 50, est mélangée à un volume égal du même virus (concentration finale 1/100). Contact pendant une heure quarante-cinq minutes à 37°. Inoculation au *Cynocephalus babuin* n° 372. Le dixième jour, le singe montre de la faiblesse musculaire, marche en steppant, se heurte aux obstacles. Le dix-huitième jour, l'asthénie est très marquée, la tête est en opisthotonos. Il est sacrifié le vingt-cinquième jour.

*Examen microscopique* : altérations caractéristiques et assez intenses du névraxe.

4° *Bile*. A 0 c.c. 5 de bile de lapin, on ajoute 1 cent. cube de l'émulsion virulente utilisée dans les essais précédents. Contact pendant cinq heures trente minutes à 37°. Inoculation au *Cynocephalus babuin* n° 373. Le cinquième jour, parésie du bras droit, tremblements. Le dixième jour, le singe se heurte aux obstacles et montre de l'incoordination des mouvements. Le quinzième jour, on note de la mydriase. Etat agonique le vingt-deuxième jour; on le sacrifie.

*Examen microscopique* : lésions névraxiques caractéristiques et intenses.

Ces expériences montrent que parmi les antiseptiques examinés, seul le formol, à la concentration de 1/1.000, a supprimé l'activité pathogène du virus lymphogranulomateux *IN VITRO*. Quant à la bile, elle s'est montrée dépourvue de propriétés virulicides.

i) ACTION DE L'ÉLECTROPHORÈSE. — Le 29 mai 1931, une émulsion virulente du cerveau du Cynocéphale n° 342 est soumise à l'électrophorèse, dans l'appareil de P. Lépine (1). On remplit la branche centrale avec l'émulsion clarifiée par décantation, et les branches latérales avec de l'eau physiologique. Dans les trois branches, le *pH* des liquides est de 7,3, sans changement pendant toute l'expérience. Durée de passage du courant : une heure cinquante minutes. Intensité : 7,2 mA. Différence de potentiel : 112-114 volts. Pas de modifications visibles aux

(1) LÉPINE, C. R. de la Soc. de Biol., 105, 1930, p. 282.

Annales de l'Institut Pasteur, t. XLVIII, n° 1, 1932.

bornes de gélose. On recueille alors le liquide des branches polarisées, comme suit :

1<sup>o</sup> *Pôle négatif*. Le liquide recueilli au *pôle négatif* est inoculé, par voie intracérébrale, au :

*Cynocephalus babuin* n° 353. L'animal, bien portant, est sacrifié le quarante-deuxième jour. Cultures du cerveau et du sang du cœur : *négatives*.

*Examen microscopique* : aucune lésion du névraxe.

2<sup>o</sup> *Pôle positif*. Le liquide recueilli au *pôle positif* est inoculé au :

*Cynocephalus babuin* n° 354. Le cinquième jour, l'animal paraît malade, ne mange pas, hésite à sauter. Cet état se maintient jusqu'au vingt-huitième jour, lorsqu'on observe une faiblesse marquée des membres postérieurs. Il est sacrifié le quarante et unième jour. Cultures du cerveau et du sang du cœur : *négatives*.

*Examen microscopique* : altérations névraïques très accusées et caractéristiques.

Il résulte de cette expérience que, soumis à l'électrophorèse, le virus lymphogranulomateux, à pH-7,3, se concentre au pôle positif, se comportant ainsi à l'exemple d'autres ultravirus [herpès, encéphalite, peste aviaire, etc.] (1).

j) **ESSAIS DE CULTURE.** — Nous avons réalisé de nombreux essais de culture sur la plupart des milieux aérobies et anaérobies usuels, y compris ceux utilisés pour l'isolement du bacille de Ducrey. Tous ces essais sont restés, jusqu'à présent, complètement négatifs.

Il en fut de même de nos tentatives de culture dans des sacs en collodion. Ces sacs, contenant du sérum simien ou humain, ont été ensemencés avec une émulsion névraïque riche en virus lymphogranulomateux, puis placés dans le péritoine des lapins. Ceux-ci ont été sacrifiés sept et quinze jours après l'opération. Le contenu des sacs était stérile; il ne contenait aucun germe visible au microscope. Il fut inoculé aux singes suivants :

*Cynocephalus babuin* n° 350 (sac de sept jours). L'animal est sacrifié le quarante-quatrième jour; résultat négatif.

*Cynocephalus babuin* n° 361 (sac de quinze jours). L'animal est sacrifié le trente-cinquième jour. Aucune lésion microscopique.

*Cynocephalus babuin* n° 362 (sac de quinze jours). L'animal est sacrifié le trente-cinquième jour; même résultat négatif.

(1) LÉPINE, C. R. Soc. de Biol., 104, 1930, p. 103, 385 et 760; 105, p. 235.



*La culture IN VITRO du virus lymphogranulomateux sur les milieux habituels et dans des sacs en collodion placés dans le péritoine des lapins paraît actuellement impossible. Nous essayons cette culture en présence d'éléments cellulaires cultivés hors de l'organisme, méthode ayant permis la survie et la multiplication des virus de la rage, de la poliomyélite et de l'herpès (Levaditi).*

*Conclusions.* — L'ensemble de ces expériences, concernant les propriétés du virus lymphogranulomateux, nous autorise à formuler les conclusions suivantes :

*L'agent étiologique de la maladie de Nicolas et Favre est un virus filtrable, pathogène pour la plupart des espèces simiennes et se prêtant à des passages en série. Les différentes souches isolées chez l'homme sont d'une virulence inégale, sans que l'on puisse établir de relations entre le degré de cette virulence et l'aspect clinique de la maladie humaine. Malgré de nombreux passages sur le singe, le virus lymphogranulomateux conserve son pouvoir pathogène pour l'homme. Ce virus est détruit à 60°; il continue à être actif, au moins pendant dix jours, à — 2°, — 3°. Toutefois, contrairement aux virus des Ectodermoses neurotropes, le germe lymphogranulomateux devient rapidement apathogène au contact de la glycérine, ou à l'état sec. Le formol à 1/1.000 le stérilise, alors que l'eau oxygénée à 1/100 et l'iode (Lugol à 1/100) paraissent sans action. Il en est de même de la bile. Soumis à l'électrophorèse, le microbe filtrable de la maladie de Nicolas et Favre se concentre au pôle positif. Tous les essais de culture in vitro et in vivo (sacs en collodion) sont restés négatifs.*

#### CHAPITRE IV

##### RÉCEPTIVITÉ DES ESPÈCES ANIMALES AUTRES QUE LE SINGE

*a) LAPINS.* — Nous avons réalisé d'innombrables tentatives de transmission de la maladie de Nicolas et Favre au lapin, en nous servant de souches *simiennes* de virus, et en utilisant toutes les voies d'inoculation possibles : cornéenne, intraoculaire, intracérébrale, testiculaire, intraganglionnaire, etc. Ces

tentatives sont restées, jusqu'à présent, entièrement infructueuses, ce qui nous dispense de relater ici les protocoles détaillés de nos expériences.

b) SOURIS. — Il n'en est pas de même de l'inoculation à la souris. Nous inspirant de recherches de Levaditi, Sanchis-Bayarri, Lépine et M<sup>lle</sup> Schœn (1) sur l'encéphalomyélite provoquée par le *Toxoplasma cuniculi*, recherches ayant montré la conservation des toxoplasmes dans l'encéphale de souris apparemment bien portantes, nous avons entrepris des essais analogues avec le virus lymphogranulomateux.

EXPÉRIENCE VI. — Le 3 juin 1931, on prépare une émulsion avec des fragments d'écorce cérébrale du *Cynocephalus babuin* n° 351, mort le septième jour. Cette émulsion est inoculée, par voie intracérébrale, à des souris numérotées de 1 à 5.

*Souris n° 1*, en apparence bien portante, est sacrifiée le cinquième jour.

*Examen histologique du cerveau* : méningite corticale en plaques, constituée par des lymphocytes et des gros mononucléaires. Altérations analogues au niveau des plexus choroïdes. Une émulsion cérébrale est inoculée, par voie transcranienne, au *Cynocephalus babuin* n° 366 (10 juin). Le dixième jour, l'animal paraît malade, refuse de manger. Le 26 juin il est couché, agonisant. Mort le seizième jour.

Cultures du cerveau et du sang du cœur : *négatives*.

*Examen microscopique* : altérations très intenses et caractéristiques du cerveau, de la protubérance et de la moelle épinière.

*Souris n° 2*, sacrifiée le vingt-deuxième jour (en apparence bien portante). *Examen histologique. Cerveau* : lésions intenses des plexus choroïdes, prolifération des éléments épendymaires, infiltration monocytaire, manchons périvasculaires.

*Rate* : hyperémie intense et accumulation de pigments hématiques.

Le cerveau de cette souris sert à préparer une émulsion qui est inoculée, le 27 juin, par voie intracérébrale, au :

*Cynocephalus babuin* n° 383. — Le troisième jour, on constate des crises épileptiformes (convulsions violentes, salivation). Le 1<sup>er</sup> juillet, faiblesse musculaire. Le 4 juillet, chaque fois que l'animal est sorti de sa cage, une nouvelle crise épileptiforme se déclare. Membres écartés et raidis, secousses myocloniques. Ces accès surviennent dès que l'on excite l'animal. Le singe est sacrifié le seizième jour. Cultures du cerveau et du sang du cœur *négatives*.

*Examen histologique* : altérations caractéristiques du névraxe.

*La rate et le sang du cœur* de la même souris, mélangés, sont inoculés, par voie intracérébrale, au :

*Cynocephalus babuin* n° 384. Le troisième jour, l'animal est pris, par intermittence, de tremblements et de grincements de dents. Le quatrième jour,

(1) LEVADITI, SANCHIS-BAYARRI, LÉPINE et M<sup>lle</sup> SCHÖEN. Ces *Annales*, 73, 1929, p. 1063.

crises épileptiformes, pendant lesquelles les membres antérieurs sont contracturés. Salivation, agitation, incoordination des mouvements. Le septième jour, faiblesse musculaire. Le singe est *sacrifié*.

*Examen histologique* : altérations caractéristiques du névraxe.

*Souris n° 3, sacrifiée le vingt-deuxième jour* (en apparence bien portante), *Examen histologique du cerveau* : altérations intenses, localisées dans les plexus choroïdes et dans la substance nerveuse, au contact des parois ventriculaires, près des noyaux centraux. Desquamation des épithéliums épendymaires, infiltration par des lymphocytes et des gros mononucléaires. Méningite monocytaire des septums. Manchons périvasculaires constitués par des monocytes et des cellules plasmatiques. Légères plaques de méningite corticale.

*Souris n° 4, sacrifiée le trente-cinquième jour* (en apparence bien portante).

*Examen histologique* : *cerveau* : absence de lésions. *Foie* : les capillaires sont remplis de monocytes. Présence de gros nodules lymphocytaires périvasculaires. Les noyaux des cellules hépatiques sont hypertrophiés et très riches en chromatine. Transformation myéloïde de la rate.

*Souris n° 5, sacrifiée le trente-cinquième jour* (en apparence bien portante).

*Examen histologique*. *Cerveau* : légère infiltration monocytaire des septums. Le cerveau sert à préparer une émulsion qui est inoculée, par voie intracérébrale, le 10 juillet au :

*Cynocephalus babuin n° 323*. L'animal, en apparence bien portant, est *sacrifié* le quarante-sixième jour.

*Examen microscopique* : absence de lésions.

### Ces expériences prouvent :

1° *Que le virus lymphogranulomateux, entretenu par des passages sur le singe, détermine, lorsqu'il est inoculé par voie intracérébrale à des souris blanches, des altérations inflammatoires des plexus choroïdes et du parenchyme cérébral, ainsi que des lésions prolifératives lymphogènes du foie;*

2° *Que le même virus est présent dans l'encéphale, dans la rate et dans le sang de ces souris, sans provoquer de troubles morbides apparents. Il y persiste au moins pendant vingt-deux jours (1).*

On ne peut s'empêcher de rapprocher cette conservation du virus de la maladie de Nicolas et Favre dans le névraxe de la souris, de la persistance, dans le même névraxe, du *Toxoplasma cuniculi* (Levaditi, Sanchis-Bayarri, Lépine et M<sup>lle</sup> Schœn, *loc. cit.*), de l'*Encephalitozoon cuniculi* [Levaditi, Nicolau et M<sup>lle</sup> Schœn (2)], du *virus récurrentiel* [Buschke et Kroó (3),

(1) LEVADITI, RAVAUT, LÉPINE et M<sup>lle</sup> SCHÖEN. *C. R. Soc. de Biologie*, **107**, 1931, p. 1525.

(2) LEVADITI, NICOLAU et M<sup>lle</sup> SCHÖEN. *Ces Annales*, **38**, 1924, p. 651.

(3) BUSCHKE et KROÓ. *Klin. Woch.*, **1**, 1922, p. 2470.

Levaditi et Anderson (1)], et, fait classique, du germe filtrable du *typhus exanthématique* chez le cobaye (Ch. Nicolle et ses collaborateurs). *Le système nerveux apparaît ainsi comme un milieu propice à la conservation de certains germes à affinités neurotropes, chez des animaux qui semblent, du moins en apparence, en état de parfaite santé.*

c) RATS BLANCS. CHATS. — Plusieurs essais ont été faits sur des rats blancs et des jeunes chats (inoculations intracérébrales). Toutes les tentatives de transmission à ces espèces animales sont restées, jusqu'à présent, infructueuses.

Conclusions. — *Excepté les singes catarrhiniens et la souris, aucune des espèces animales examinées (lapins, rats, chats) ne s'est montrée susceptible de contracter l'infection provoquée par le virus de la maladie de Nicolas et Favre (2).*

## CHAPITRE V

### SYMPTOMATOLOGIE DE LA MALADIE EXPÉRIMENTALE

La symptomatologie de la maladie expérimentale du singe, consécutive à l'inoculation transcrânienne du virus lymphogranulomateux, est complexe et des plus riches en troubles morbides. Ce qui prédomine, ce sont les signes traduisant une irritation intense des méninges cérébro-médullaires. Tels sont la raideur de la nuque, l'opisthotonos, les grincements de dents, les contractures musculaires, et surtout les crises épileptiformes. Celles-ci apparaissent soit spontanément, soit à la suite d'une excitation, durent quelques minutes et peuvent se

(1) LEVADITI et ANDERSON. *C. R. Acad. des Sciences*, 126, 1928, p. 653.

(2) Les inoculations intracérébrales à des cobayes sont restées sans résultat. De même, dans leurs tentatives de transmission de la maladie de Nicolas et Favre à des lapins et à des cobayes inoculés par voie intracrânienne, les auteurs suédois ont abouti à des résultats pareillement négatifs (communication orale de C. Kling). Cependant, dans un travail récent, KURT MEYER, ROSENFELD et ANDERS (*Klin. Woch.*, 10, 1931, p. 4653) affirment avoir isolé des cas de lymphogranulomatose inguinale, un virus filtrable, résistant à la glycérine et pathogène pour le cobaye. Nous nous proposons de vérifier ces expériences. L'un de nous (Ravaut, *loc. cit.*) a obtenu des tuméfactions ganglionnaires chez des cobayes inoculés avec le virus lymphogranulomateux et publié ces résultats en 1924 (RAVAUT, BOULIN et RABEAU, *Annales de Dermatologie et Syphiligraphie*, août 1924).



répéter plusieurs fois par jour. Elles s'accompagnent de salivation et de phénomènes oculaires (mydriase). Par ailleurs, on note fréquemment des faiblesses musculaires, des parésies ou de véritables paralysies, des tremblements, ainsi qu'une incoordination motrice. L'animal se débat et se jette contre les parois de la cage. Vers la fin, le singe est affaibli, maigre, reste étendu et entre dans le coma.

Tout autre est la symptomatologie et l'évolution de la maladie chez le singe, lorsque le virus est inoculé par *voie préputiale* ou *intra-ganglionnaire*. Dans ce cas, nulle manifestation clinique dénotant une atteinte du système nerveux. Tout se limite à un accident primitif fugace et à une polyadénie inguinale bilatérale, symptômes et lésions que nous décrirons au *Chapitre VII*, consacré à l'étude des voies de pénétration du virus lymphogranulomateux.

Ajoutons que l'examen du *liquide céphalo-rachidien* des singes inoculés par voie transcranienne, recueilli par ponction sous-occipitale peu avant la mort de l'animal, révèle une *pleïocytose* pouvant atteindre parfois plus de 300 lymphocytes par millimètre cube.

## CHAPITRE VI

### HISTOLOGIE PATHOLOGIQUE

Rien n'est plus facile que le diagnostic microscopique de la méningo-encéphalite expérimentale du singe, avant l'achèvement des coupes rapides (congélation), ou des préparations colorées après inclusion à la paraffine ; *un simple examen des frottis d'écorce cérébrale suffit*. On réalise ces frottis en étalant, en couche mince, un petit fragment de méninges et de substance nerveuse sous-jacente, en fixant à l'alcool et en colorant au Giemsa rapide. La figure 4 montre l'aspect d'un tel frottis. Au lieu de quelques rares noyaux de cellules nerveuses, présents chez les singes normaux, on observe ici des hématies, de gros mononucléaires à protoplasma basophile, de nombreux lymphocytes et de rares cellules plasmatiques. Nous avons eu parfois sous les yeux des préparations qui donnaient l'impression d'avoir été faites avec des ganglions, ou du sang

de sujets atteints de leucémie lymphatique, tellement elles étaient riches en éléments de la série lymphogène.

Quoi qu'il en soit, c'est l'examen des *coupes microscopiques* qui permet de préciser la nature et l'intensité des altérations de la maladie de Nicolas et Favre expérimentale.

Les caractères de ces altérations diffèrent suivant qu'il s'agit

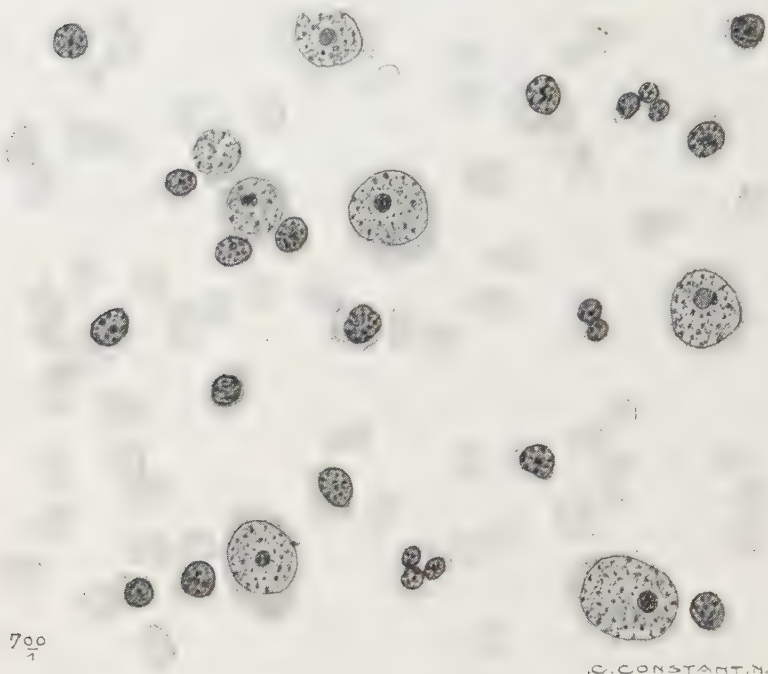


FIG. 1. — *Macacus cynomolgus* 238. Mort le huitième jour. Frottis de méninges basales. Hématies, lymphocytes, gros mononucléaires et débris de cellules nerveuses. Giemsa. Gross. : 700/1.

de *cas à évolution rapide* (mort de l'animal en cinq à huit jours), ou de *singes ayant survécu et que l'on sacrifie (forme inapparente)*. Dans les cas aigus, il y a prédominance des lésions inflammatoires; les éléments polynucléaires et la tendance à la suppuration prévalent. Au contraire, dans les cas chroniques, les modifications histopathologiques revêtent un aspect lymphoïde et néoformatif des plus marqués.

Les *méninges des septums* sont le siège d'une exsudation

fibrino-leucocytaire intense. Toute la pie-mère est parsemée de globules blancs polynucléaires, constituant, par endroit, de véritables foyers où les globules apparaissent dégénérés, pycno-



FIG. 2. — *Macacus cynomolgus* 238. Mort le huitième jour. Infiltration polynucléaire et monocytaire des méninges septales (écorce antérieure). Giemsa. Gross. : 50/1.

tiques, caryolysés. A cette phase aiguë (fig. 2), succède une autre, où l'on décèle des éléments de la série lymphoïde : lymphocytes, cellules plasmatiques, et surtout gros mononucléaires à cytoplasma basophile, à noyaux vésiculeux et riches

en chromatine, à nucléole volumineux. Ces cellules se vacuolisent progressivement (fig. 3) et s'accumulent autour des vaisseaux (fig. 4). Elles renferment des *inclusions* : masses de chromatine provenant de la pycnose des polynucléaires, et hématies à tous les stades de l'hémolyse intracellulaire (formation de pigment hématique). Les monocytes vacuolisés res-

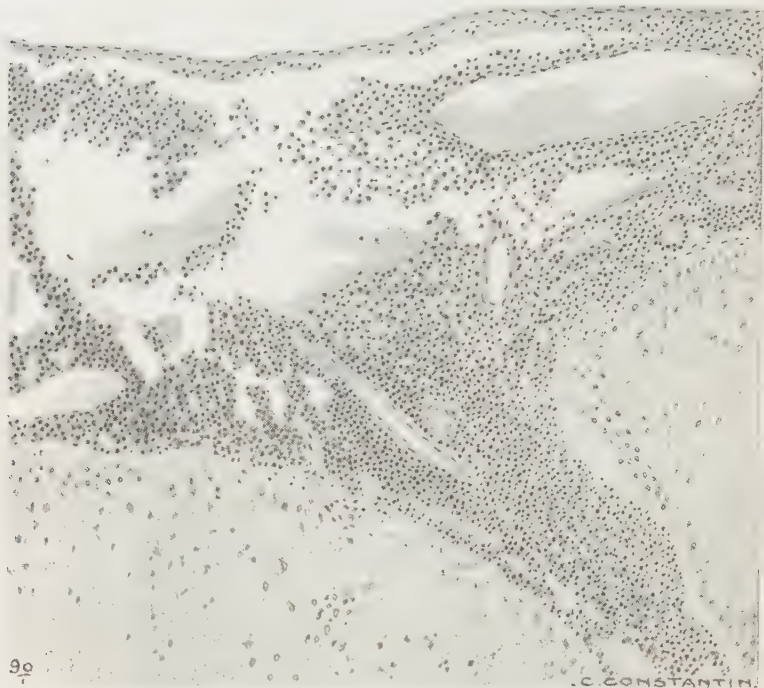


FIG. 3. — *Macacus cynomolgus* 161. Mort le septième jour. Infiltration des méninges cortico-septales par des monocytes et des cellules granulo-adipeuses. Ecorce postérieure. Hémalun. Gross. : 90/1.

semblent à s'y méprendre aux cellules granulo-adipeuses que l'on rencontre en abondance dans les foyers d'encéphalite chronique expérimentale (herpès).

Mais, ce qui est frappant et caractéristique, c'est la genèse, autour de certains gros vaisseaux, de véritables petits *follicules lymphatiques*, lymphomes microscopiques dont l'aspect et l'architecture histologiques ne diffèrent pas de ceux des centres germinatifs des ganglions lymphatiques. Ces follicules (fig. 5 et 6)



sont constitués par des lymphocytes et des petits mononucléaires à cytoplasma basophile. Ils paraissent comporter un stroma fibrillaire dont le réseau a, comme point d'appui, la paroi vasculaire. Souvent ces lymphomes siègent dans la tunique moyenne d'une veine, dont ils soulèvent l'endothélium et, parfois, le traversent (fig. 7). *L'aspect de ces altérations et la fréquence des caryocinèses leur confèrent un caractère néoformatif, à rapprocher de celui des ganglions humains atteints de lymphogranulomatose inguinale* (fig. 17, 18, 19). Ainsi que

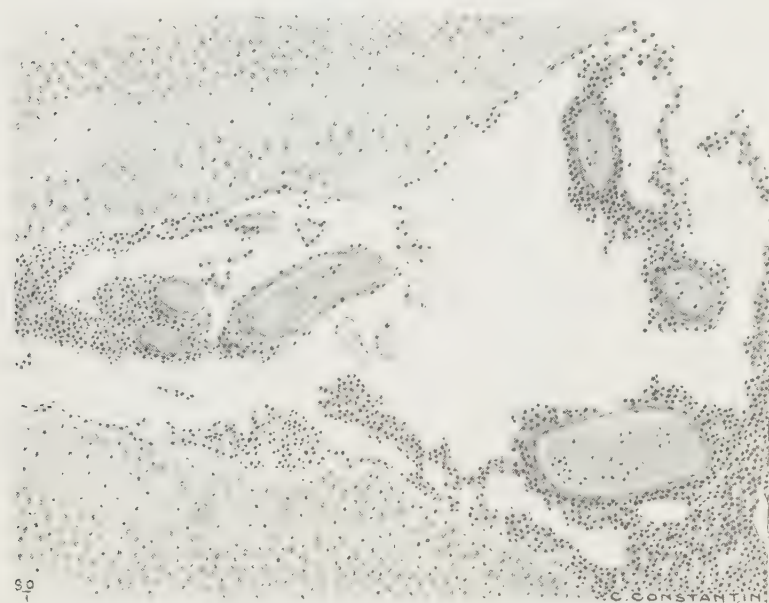


FIG. 4. — *Macacus cynomolgus* 161. Sacrifié le septième jour. Infiltration des méninges des septums par des gros mononucléaires. Noyaux centraux. Giemsa. Gross. : 90/1.

l'ont déjà fait remarquer Hellerström et Wassén (*loc. cit.*), on trouve des deux côtés les mêmes éléments constitutifs et la même disposition cytologique, une preuve de plus en faveur du caractère étiologique spécifique du virus lymphogranulomateux.

Ces altérations apparaissent également dans la *pie-mère corticale*, où elles sont souvent disposées par plaques irrégulièrement réparties (fig. 8).

Les *plexus choroïdes* sont parfois très lésés. Au milieu d'une exsudation séro-fibrineuse qui dilate à l'extrême les ventricules, ces plexus montrent une desquamation des éléments

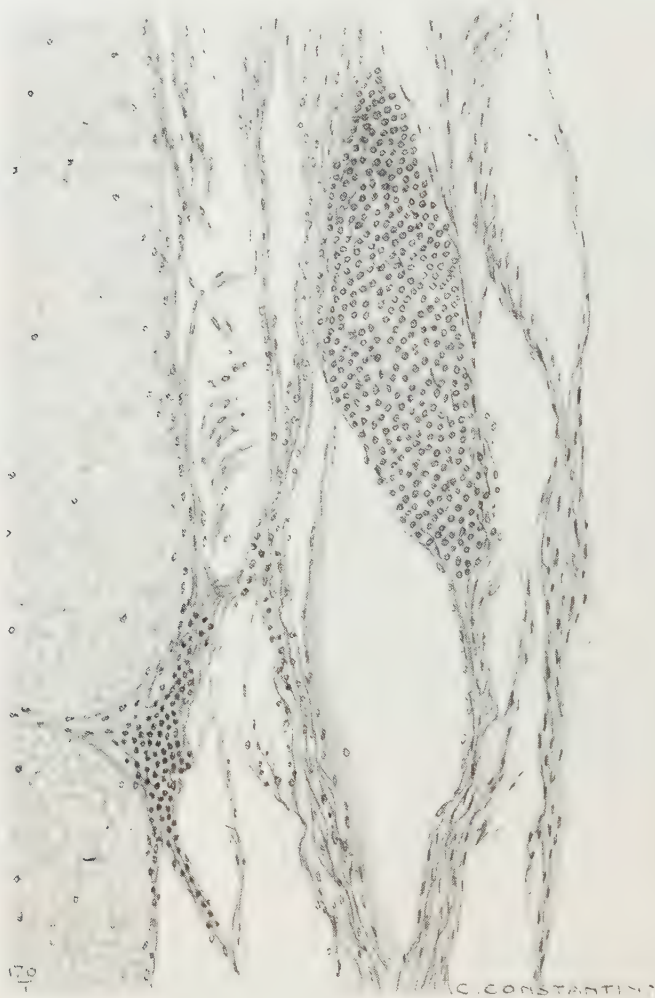


FIG. 5. — *Macacus inuus* 247. Sacrifié le quarante-septième jour. Lymphome périvasculaire au niveau des méninges médullaires. Hémalum. Gross. : 170/1.

épithéliaux, une infiltration lymphocytaire et des follicules lymphatiques périvasculaires (fig. 9). Parfois, cette infiltration se propage sous la paroi du ventricule, qu'elle détache du

parenchyme névraxique, occasionnant ainsi la genèse de cavités plus ou moins confluentes (fig. 10).

La substance nerveuse proprement dite n'est pas exempte de modifications histologiques. On y rencontre, surtout au voisinage des méninges, soit des *manchons périvasculaires monocytaïres* (fig. 11 et 12), soit de petits *foyers d'encéphalite* (fig. 13). Ceux-ci sont situés au voisinage des vaisseaux et sont constitués par des lymphocytes et des éléments mononucléaires d'aspect mésoglique.

Parfois, la *substance blanche* offre des lésions caractérisées

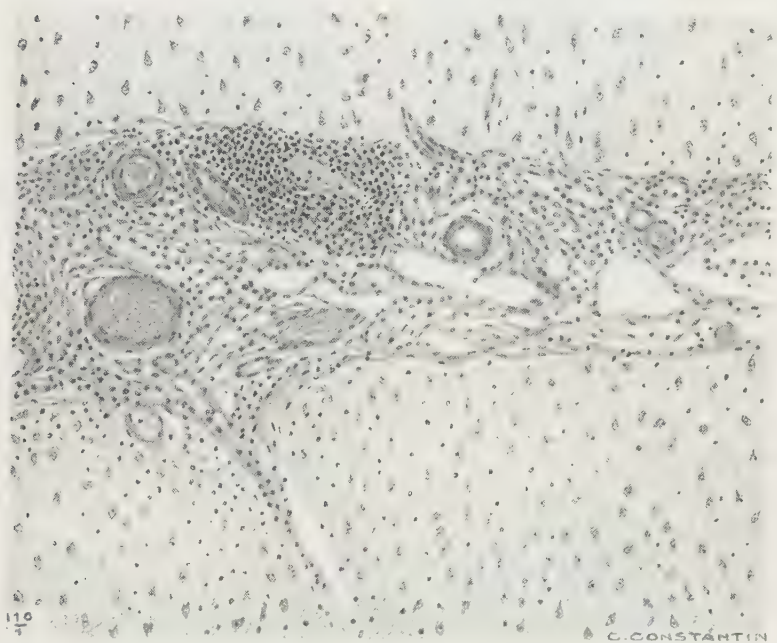


FIG. 6. — *Macacus cynomolgus* 161. Mort le septième jour. Lymphome périvasculaire au niveau des méninges septales. Ecorce antérieure. Giemsa. Gross. : 100/1.

par une dilatation vasculaire et des manchons d'intensité moyenne (fig. 14).

Ces altérations méningées et névraxiques intéressent les éléments d'origine mésodermique : pie-mère et vaisseaux. Les cellules nerveuses, au contraire, paraissent conserver leur intégrité morphologique. Quoi qu'il en soit, aucun segment

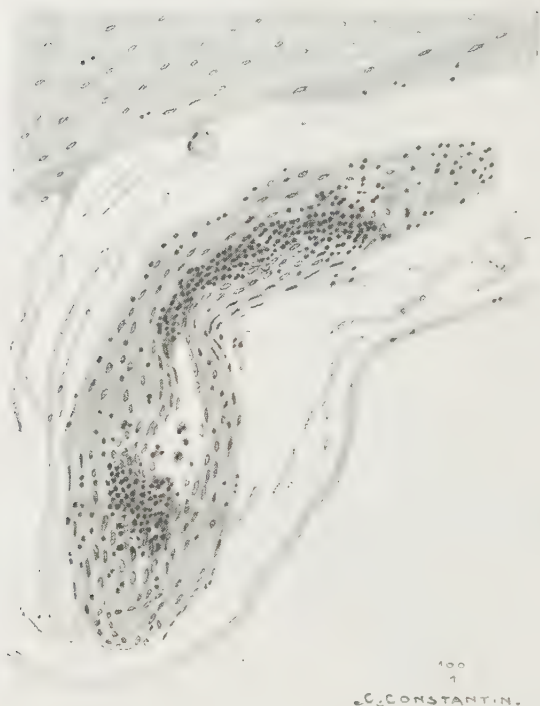


FIG. 7. — *Macacus cynomolgus* 237. Sacrifié le trente-deuxième jour. Foyers lymphocytaires dans la paroi d'une veine. Corne d'Ammon. Giemsa. Gross. : 100/1.

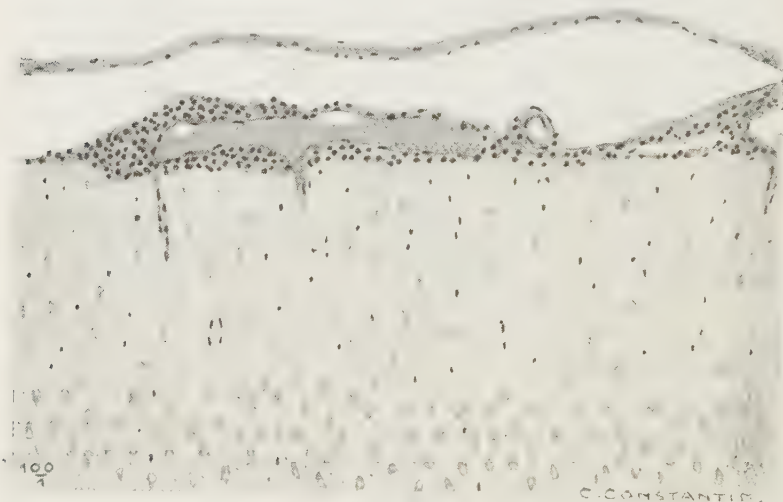


FIG. 8. — *Macacus cynomolgus* 237. Sacrifié le trente-deuxième jour. Légère infiltration monocytaire dans les méninges corticales. Ecorce antérieure. Giemsa. Gross. : 100/1.



méninge n'échappe à l'atteinte du virus. En effet, on rencontre les lésions décrites ci-dessus dans toute l'étendue de la *corticalité cérébrale*, dans les *noyaux centraux*, la *corne d'Ammon*, la *protubérance*, le *bulbe*, et, très souvent, dans la *moelle épinière*.

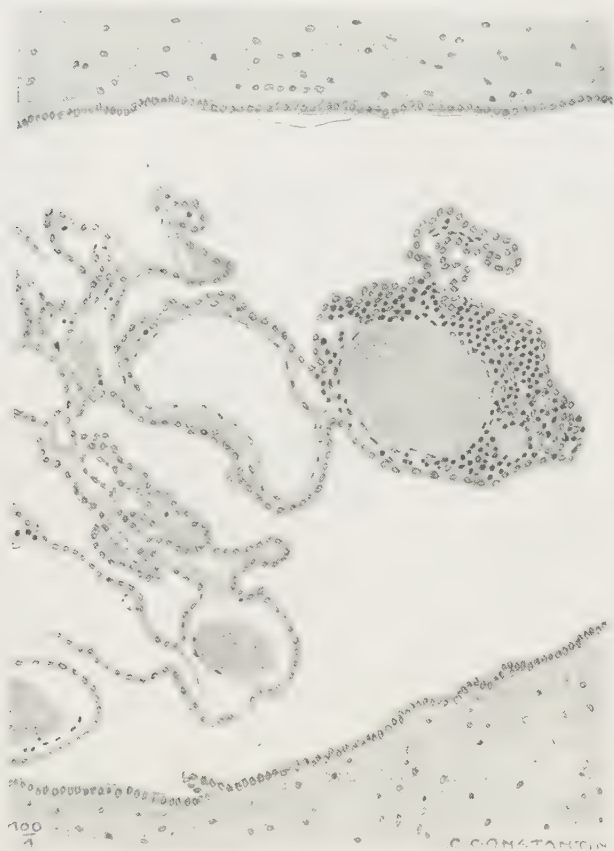


FIG. 9. — *Cynocephalus babuin* 342. Sacrifié mourant le neuvième jour. Lymphomes périvasculaires au niveau des plexus choroïdes. Corne d'Ammon. Hémalun Gross. : 400/1.

Elles paraissent plus marquées à la base du cerveau et au niveau de la région lombaire de cette moelle.

Les *altérations médullaires* sont des plus caractéristiques. Si elles épargnent le parenchyme proprement dit (substance grise des cornes et cordons), par contre elles se concentrent dans

les méninges et les racines. Il s'agit d'une méningite soit à polynucléaires (cas aigus), soit à monocytes (cas chroniques), du même type que celle observée dans l'encéphale. Cette méningite se propage aux racines, où l'on décèle des lésions de *péri* et d'*endonévrite*, avec formation de *lymphomes périvasculaires*

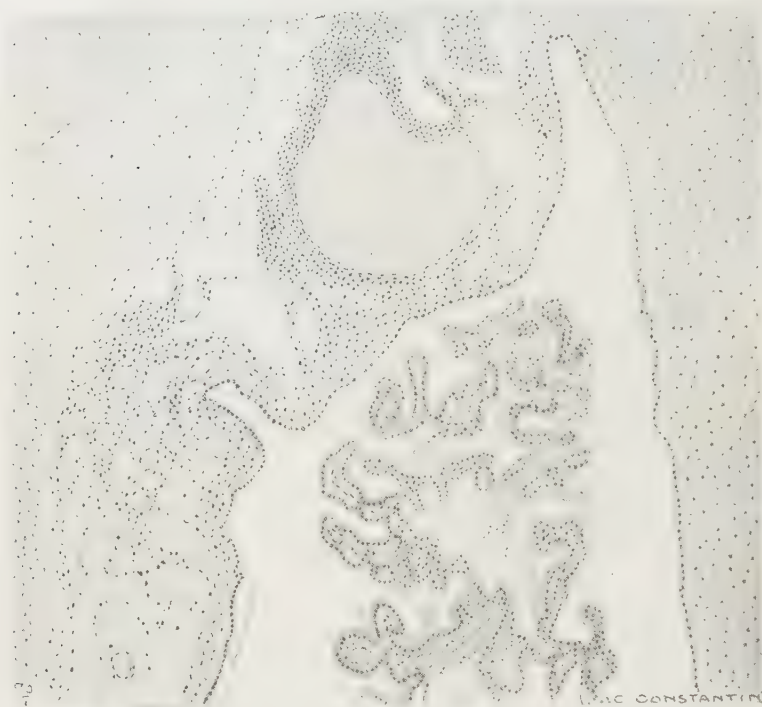


FIG. 10. — *Cynocephalus babuin* 342. Sacrifié le neuvième jour. Altérations des plexus choroides. Formations cavitaires sous-épendymaires Hémalum. Gross. : 70/1.

*lares* (fig. 15 et 16). Les neurones des *ganglions intervertébraux* sont exempts de modifications pathologiques.

Nous n'avons jamais rencontré des formations pouvant être rattachées à un type parasitaire quelconque. Cependant, nous avons observé une *dégénérescence particulière de la chromatine* nucléaire des éléments appartenant à la série lymphocytaire, dégénérescence que nous avons reproduite dans la figure 7 de la *Planche IV*. La chromatine se concentre sur la paroi du

noyau, et, lorsque celui-ci éclate, elle se fige sur le bord du cytoplasme.

En outre, nous avons rencontré une espèce particulière de monocytes contenant des formations globuleuses oxyphiles, présents également dans les ganglions lymphatiques virulents de certains singes (fig. 22). Nous reviendrons plus loin sur les particularités microscopiques de ces éléments (1).

Conclusions. — *Les altérations névraziques provoquées par l'inoculation transcranienne du virus lymphogranulomateux, sans*

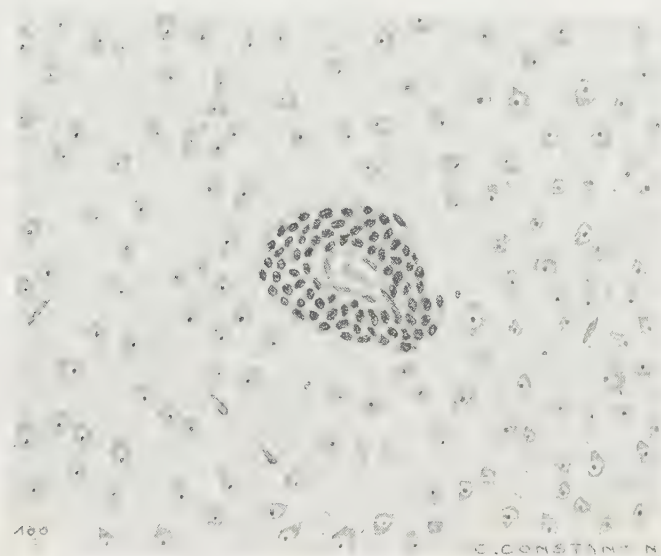


FIG. 11. — *Macacus cynomolgus* 237. Sacrifié le trente-deuxième jour. Manchon périvasculaire sous-cortical. Ecorce postérieure. Giemsa. Gross. : 100/1.

*présenter des caractères absolument spécifiques, offrent des particularités permettant de les différencier des lésions déterminées par le neurovaccin ou par le virus herpéto-encéphalitique. Inflammatoires et suppuratives à la période aiguë de la maladie, nettement prolifératives et lymphogènes au stade chronique de l'infection, ces altérations se localisent, de préférence, dans le système mésodermique de l'axe cérébro-spinal : méninges, plexus*

(1) Ajoutons que nous n'avons pas observé dans les organes des altérations pouvant être rattachées à la présence du virus lymphogranulomateux.

*choroïdes et vaisseaux. Leur étendue varie suivant l'intensité du processus infectieux, sans que, toutefois, les cellules dérivées de l'ectoderme invaginé (neurones et neuroglie) en subissent l'atteinte. La lymphogranulomatose névraque du singe nous apparaît ainsi comme une mésodermose neurotrophe, à opposer*

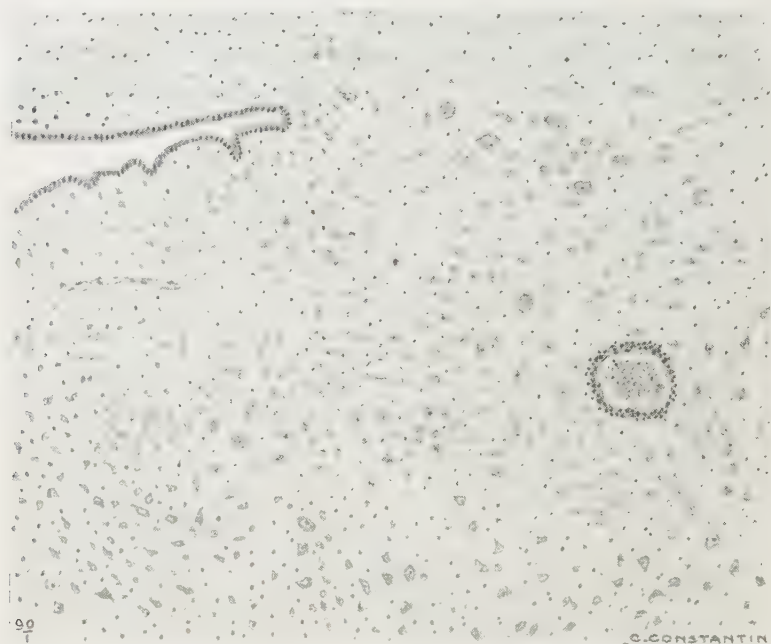


FIG. 12. — *Macacus cynomolgus* 161. Mort le septième jour. Manchon périvasculaire au niveau de la protubérance. Giemsa. Gross. : 90/1.

*aux Ectodermoses neurotropes, décrites par l'un de nous (neurovaccin, herpès, encéphalite, rage et poliomyélite).*

## CHAPITRE VII

### VOIES DE PÉNÉTRATION DU VIRUS

a) La VOIE NÉVRAXIQUE est, sans nul conteste, une de celles qui se prêtent le mieux à la pénétration du virus lymphogranulomateux dans l'organisme du singe. La preuve en est



fournie par les résultats des expériences citées au cours des Chapitres précédents. Levaditi et Nicolau (1) ayant montré que le virus neurovaccinal, inoculé dans les veines, se localise dans le cerveau, si l'on a soin de traumatiser celui-ci par une

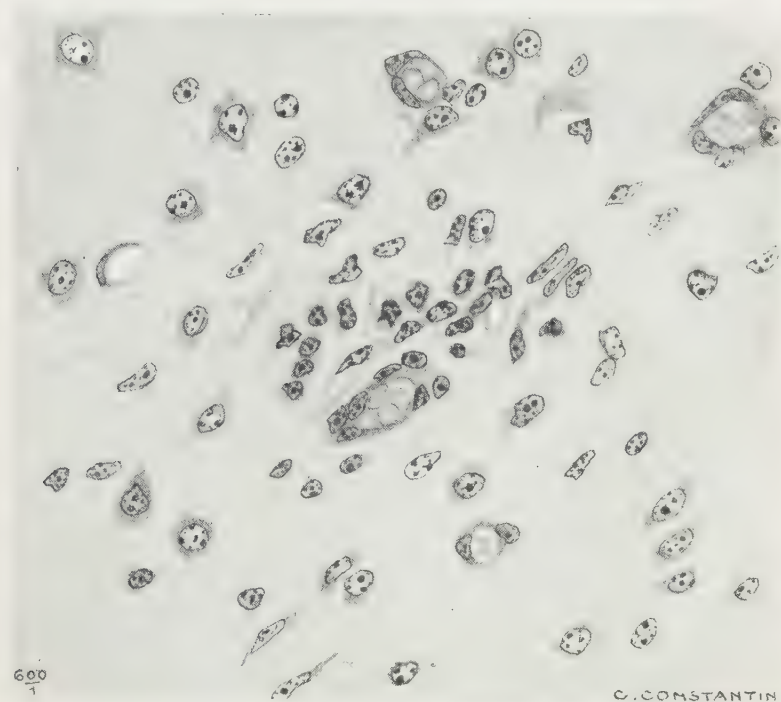


FIG. 13. — *Macacus cynomolgus* 297. Sacrifié le trente-deuxième jour. Foyer d'encéphalite. Substance blanche de la corne d'Ammon. Giemsa. Gross : 600/1.

injection *in situ* de bouillon ou d'eau isotonique, nous avons réalisé une expérience analogue avec le germe de la maladie de Nicolas et Favre.

EXPÉRIENCE VII. — Le 15 mai 1931, on centrifuge légèrement une émulsion virulente préparée avec le cerveau du *Cynocephalus babuin* n° 318, sacrifié le onzième jour. Cette émulsion est inoculée, à la dose de 3 cent. cubes, dans les veines du *Cynocephalus babuin* n° 328, en même temps que l'on pratique, chez le même animal, une injection intracérébrale de 2 cent. cubes de bouillon

(1) LEVADITI et NICOLAU. *Ces Annales*, 37, 1923, p. 1.

ordinaire. L'animal est sacrifié le cinquante-cinquième jour. Cultures du cerveau et du sang du cœur : *négatives*.

*Examen microscopique* : aucune altération du système nerveux et des organes.

*Cette expérience montre que le virus de la maladie de Nicolas et Favre, introduit dans le torrent circulatoire, ne se localise pas*



FIG. 14. — *Macacus cynomolgus* 101. Mort le septième jour. Altérations péri-vasculaires dans la substance blanche de la corne d'Ammon. Hémalum. Gross. : 90/1.

*dans le névraxe, même si celui-ci a subi un traumatisme préalable. Il en résulte que l'affinité neurotrope de ce virus est loin d'égaliser celle du neurovaccin.*

b) VOIE INTRANERVEUSE. — Comment se comporte le germe lymphogranulomateux si on l'injecte dans un nerf périphérique, tel le sciatique?

EXPÉRIENCE VIII. — Une émulsion virulente provenant du *Cynocephalus* babuin n° 318 est inoculée, à la dose de 0 c. 5, dans le nerf sciatique

gauche du *Cynocephalus babuin* n° 330. L'animal, en parfaite santé, est sacrifié le quarante et unième jour.

*Examen histologique* : aucune lésion du système nerveux central, du sciatique et des ganglions rachidiens correspondants.

L'essai montre que le *virus ne chemine pas le long des nerfs*



FIG. 15. — *Macacus cynomolgus* 238. Mort le huitième jour. Méningite monocyttaire et périnévrile radiculaire. Moelle lombaire. Giemsa. Gross. : 90/1.

périphériques pour atteindre l'axe cérébro-spinal (absence de *neuroprobasis*), encore une dissemblance entre ce virus et le neurovaccin.

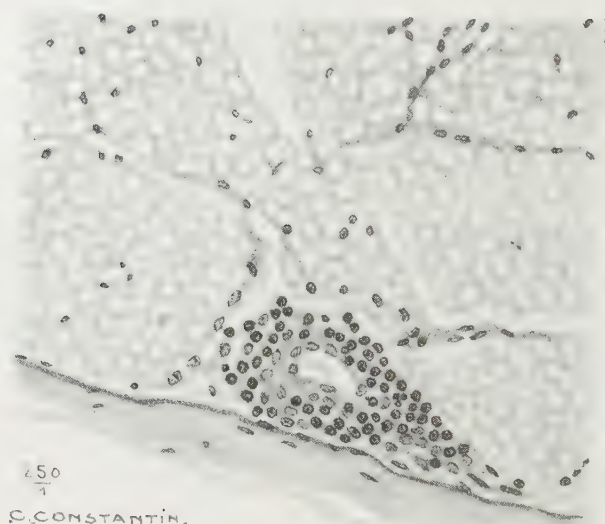


FIG. 16. — *Macacus cynomolgus* 237. Sacrifié le trente-deuxième jour. Manchon périvasculaire dans une racine postérieure. Moelle épinière. Giemsa. Gross. : 250/1.

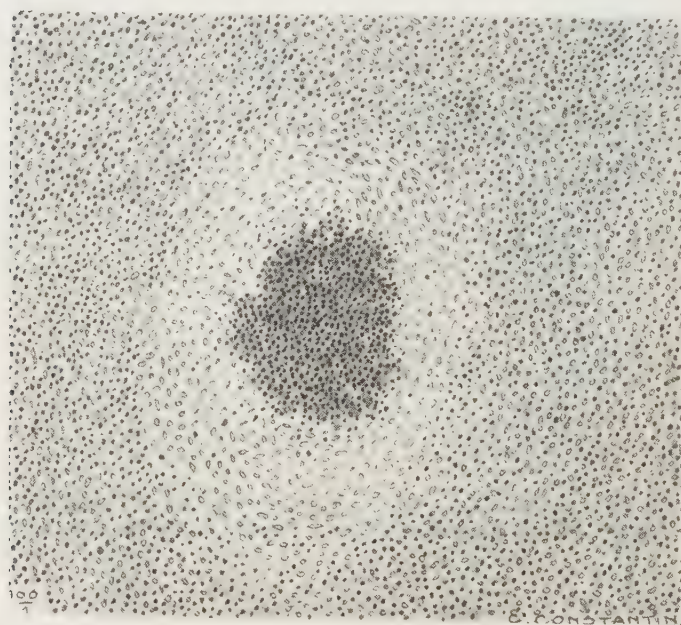


FIG. 17. — *Maladie de Nicolas et Favre*. Ganglion humain. Foyer de nécrose. Hémalum. Gross. : 100/1.



c) VOIE OCULAIRE. — Quels sont, chez le singe, les suites] de l'inoculation cornéenne ou intra-oculaire du virus lymphogranulomateux? Voici les résultats obtenus :

1° Cornée. EXPÉRIENCE IX. — Une émulsion épaisse de cerveau du *Cynocephalus babuin* n° 342, sacrifié le neuvième jour, est inoculée par scarification au *Cynocephalus babuin* n° 323. Aucune réaction cornéenne (absence de kératite) pendant toute la durée de l'expérience (vingt-cinq jours).

2° Globe oculaire. EXPÉRIENCE X. — Du virus provenant du *Macacus cyno-*

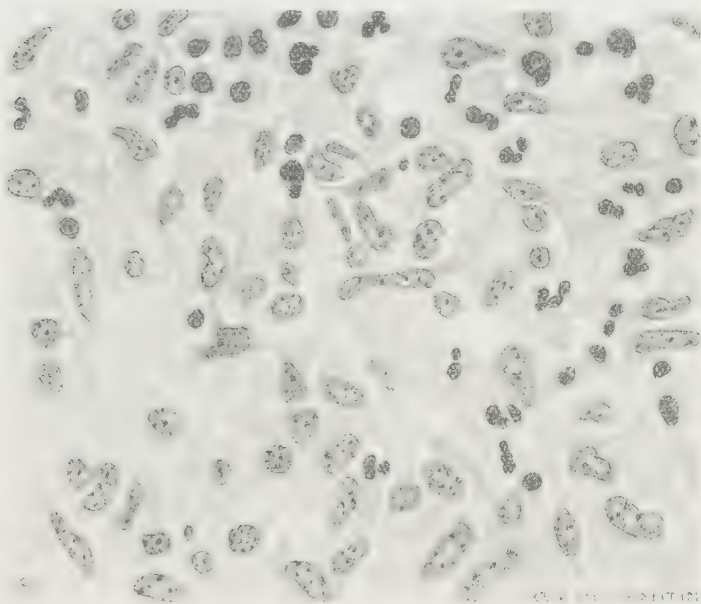


FIG. 48. — *Maladie de Nicolas et Favre*. Ganglion humain. Région voisine d'un foyer de nécrose. Lymphocytes, gros mononucléaires, polynucléaires et cellules à noyaux allongés. Hémalum. Gross. : 700/1.

*molgus* n° 306, mort le septième jour, est injecté dans la chambre antérieure et dans l'humeur vitreuse de l'œil du :

*Cynocephalus babuin* n° 307, le 24 mars 1931. Le sixième jour, on observe du larmoiement et une kératite manifestes. Le 2 avril : iritis intense, sans suppuration; le lendemain, iridochoréïdite et exsudation trouble dans la chambre antérieure, photophobie, sans kératite suppurative. Le 10 mai, kératite chronique à la partie inférieure de la cornée. Le 22 mai, M. Morax examine l'animal. Il constate une atrophie de l'œil droit, une hypotonie oculaire et une opacité de la cornée (segment inférieur); pupilles contractées, iris épaissi. Le même état se maintient jusqu'au 17 août, date à laquelle l'animal est sacrifié.

Il résulte de ces expériences que l'inoculation de virus lymphogranulomateux à la cornée, préalablement scarifiée, ne détermine pas de kératite chez le singe. Par contre, injecté dans la chambre antérieure et dans l'humeur vitreuse, il provoque une opacité partielle de la cornée et des signes d'iridocyclite, suivis d'une atrophie du globe oculaire.

Les affinités cornéotropes du germe de la maladie de Nicolas

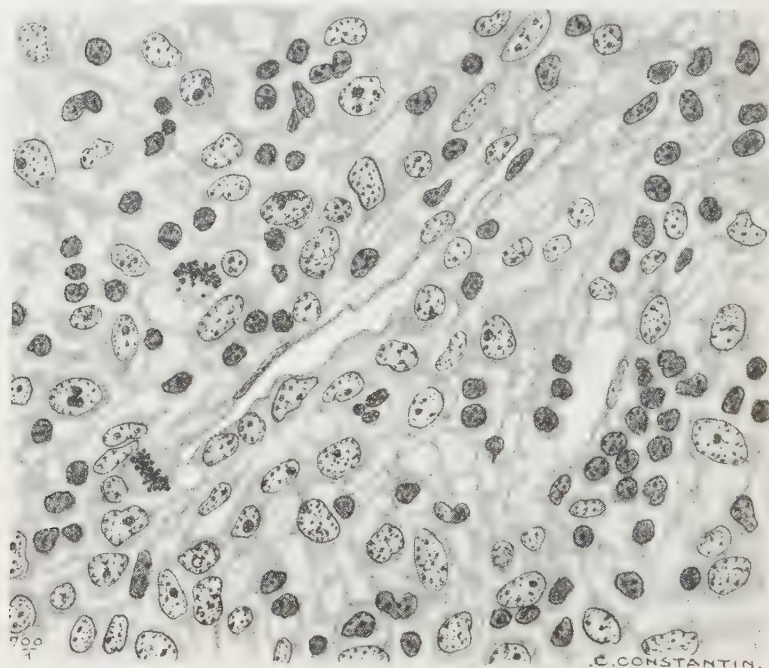


Fig. 19. — Maladie de Nicolas et Favre. Ganglion humain. Vaisseau avec hypertrophie et multiplication des cellules endothéliales. Deux cynèses. Richesse en lymphocytes et en gros mononucléaires. Hémalum. Gross. : 700/1.

et Favre semblent donc à peine marquées, et, en tous cas, très inférieures à celles du virus herpéto-encéphalitique.

d) VOIE INTRAGANGLIONNAIRE. — Nous avons inoculé le virus lymphogranulomateux dans le parenchyme des ganglions lymphatiques inguinaux des singes réceptifs. Les résultats des expériences, dont nous donnons ci-dessous les détails, sont des plus intéressants.

EXPÉRIENCE XI. — Le 24 mars 1931, on inocule une émulsion de cerveau virulent du *Macacus cynomolgus* n° 306 (mort sept jours après l'infection sous-duremérienne) dans le ganglion inguinal droit du *Cynocephalus babuin* n° 307. Le 3 avril, on constate une tuméfaction du ganglion inoculé et une polyadénite généralisée. Celle-ci s'atténue par la suite, mais montre une recrudescence manifeste vers le vingtième jour. L'adénopathie progresse, mais l'animal ne semble pas malade. Le 24 avril (soit *trente et un jours après l'inoculation*), on excise le ganglion inguinal gauche. Après une suppuration éphémère de la plaie opératoire, celle-ci se cicatrise normalement. Sitôt prélevé, le ganglion sert à préparer une émulsion dans de l'eau salée isotonique, qui est inoculée, par voie intracérébrale, au :

*Cynocephalus babuin* n° 310. L'animal commence à présenter des troubles nerveux le 15 mai, soit vingt et un jours après l'inoculation. Le 16 mai, il montre une paralysie des membres supérieurs et une parésie des membres inférieurs. Mort le vingt-quatrième jour. A la nécropsie, on constate une forte congestion des méninges et un aspect lactescent de la pie-mère, le long des sillons qui séparent les circonvolutions. Ces lésions sont surtout accentuées vers la base du cerveau. Cultures négatives.

L'examen histologique révèle la présence d'altérations caractéristiques de la méningo encéphalite provoquée par le virus lymphogranulomateux : méningite à monocytes et à polynucléaires du cortex et des *septums*, lymphomes périvasculaires, cellules granulo-adipeuses.

Le 3 juin (soit *soixante et onze jours après l'inoculation du singe* n° 307), on excise un nouveau ganglion; celui ci sert à préparer une émulsion qui est inoculée, par voie intracrânienne, au :

*Cynocephalus babuin* n° 360. L'animal, en apparence bien portant, est sacrifié le trente-sixième jour.

Examen microscopique : Ecorce antérieure. Méningite monocytaire légère. Même type de lésions au niveau de l'écorce postérieure, de la corne d'Ammon et de la protubérance.

ALTÉRATIONS DES GANGLIONS DU SINGE DONNEUR N° 307. — 1° *Prélèvement le trente et unième jour*. L'aspect microscopique du ganglion ayant servi à l'inoculation du singe n° 310 est caractéristique. Le tissu lymphoïde est en voie de prolifération active. Les vaisseaux des centres germinatifs montrent une multiplication intense de leurs endothéliums. Leur entourage immédiat est constitué par de gros monocytes à protoplasma basophile, à noyau tuméfié et vésiculeux. Les nucléoles, souvent bigéminés, sont volumineux et hyperchromatiques. Par la méthode de Mann, ces nucléoles se colorent intensément en rouge, et donnent l'impression d'inclusions ressemblant à celles décrites par Joest, dans la maladie de Bornu. Ces cellules basophiles rappellent celles que nous avons observées dans les lymphomes périvasculaires de la méningo-encéphalite lymphogranulomateuse du singe et dans les ganglions humains. Les

cinèses sont extrêmement fréquentes et à toutes les phases de leur évolution. Enfin, on relève, çà et là, des lésions hémorragiques (fig. 20 et *Planche IV*, fig. 2).

*Deuxième prélèvement, le soixante et onzième jour.* Mêmes altérations que celles décrites précédemment avec, cependant, moins de caryocinèses. Présence de pigment brun dans les monocytes et les fibroblastes. En outre, on constate des éléments que nous désignerons sous le nom de *corps*

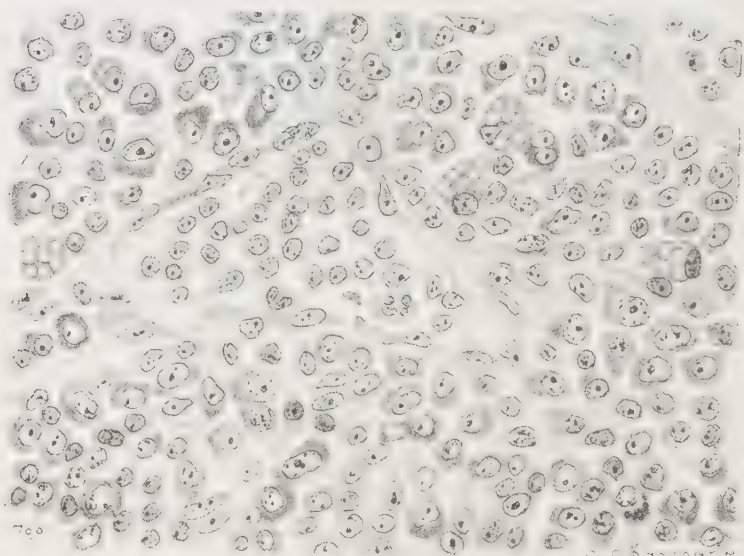


FIG. 20. — *Cynocephalus babuin* 307. Inoculation intra-ganglionnaire. Ganglion inguinal excisé le trente et unième jour (présence de virus), Vaisseau entouré de grosses cellules basophiles et de rares lymphocytes. Deux monocytes mûriformes contenant des formations globoïdes. Unna. Gross. : 700/1.

*en framboise*, situés surtout au voisinage immédiat des vaisseaux. Ces corps ont un noyau périphérique aplati et contiennent, dans leur cytoplasme, des formations arrondies, tassées les unes contre les autres, tantôt petites (2 à 3  $\mu$ ), tantôt plus volumineuses et confluentes. Ces formations, d'aspect hyalin, se colorent en *rose* par la méthode de Giemsa prolongée, en *bleu foncé* par la méthode de Mann (ce qui exclut leurs rapports avec les hématies), et en *noir* par l'hé-



matoxyline ferrique. Les réactions de l'amyloïde sont négatives.

Sans présumer de la nature de ces *corps en framboise*, nous rappellerons les avoir rencontrés également au niveau des méninges altérées, chez certains de nos singes inoculés par voie intracérébrale.

EXPÉRIENCE XII. — Le 15 mars 1931, du virus provenant du *Cynocephalus babuin* n° 318, sacrifié le deuxième jour, est inoculé dans les ganglions des deux aines du *Cynocephalus babuin* n° 331. Le 2 juin, soit le dix-huitième jour, on constate que dans l'aine droite les ganglions constituent une masse uniformément dure, du volume d'un noyau de pêche. A gauche, réaction plus intense. Les ganglions forment une masse dure, pâteuse, élastique, composée de petits nodules indurés dont un, particulièrement développé, occupe la ligne médiane. Même état le 12 juin. Vers le trente-huitième jour, on remarque un gros ganglion inguinal à droite, mais à gauche l'adénite semble en régression. Les lésions diminuent progressivement; elles persistent encore le 25 août. L'animal est gardé en observation.

EXPÉRIENCE XIII. — Le *Cynocephalus babuin* n° 399 est inoculé le 15 juillet 1931, par voie intra-préputiale et intra-ganglionnaire (ganglion de l'aine gauche), avec du virus provenant du *Cynocephalus babuin* n° 388, sacrifié le quatorzième jour. Le treizième jour, on constate une hypertrophie ganglionnaire bilatérale (glandes de la grosseur d'une cerise à droite et d'une noix à gauche). Ganglions poplités normaux, ganglions axillaires palpables). Le 31 juillet, masse ganglionnaire à gauche, bosselée, adhérente aux plans sous-jacents. Cet état persiste le 24 août. L'animal reste en observation.

Ces expériences montrent que l'inoculation du virus lymphogranulomateux dans les ganglions inguinaux provoque, chez le singe, une adénite inguinale bilatérale, apparaissant vers le quinzième jour et évoluant lentement. Les ganglions tuméfiés renferment le germe de la maladie de Nicolas et Favre, trente et un et soixante et onze jours après l'inoculation. Ils offrent des lésions prolifératives, constituées par des éléments (monocytes basophiles) ressemblant à ceux que l'on décèle dans les ganglions lymphogranulomateux humains (fig. 19) et dans la méningo-encéphalite lymphogranulomateuse du singe.

Ceci prouve l'affinité du germe pour le système lymphatique et sa pullulation active dans les ganglions des simiens réceptifs.

e) VOIE PRÉPUTIALE. — Le *Cynocephalus babuin* n° 389, qui fit l'objet de l'expérience XIII sus-citée, a été inoculé, non seulement par voie intraganglionnaire, mais aussi par injection intra-dermique au niveau du prépuce. Le treizième jour, on constate chez lui, au point d'inoculation, l'apparition d'un petit

*nodule* dur, de coloration rose, ayant le volume d'un petit pois. Le seizième jour, ce nodule, de forme sphérique, est attaché à la peau. Mobile sur le plan sous-jacent, il offre un pertuis par où s'écoule, à la pression, une goutte de liquide citrin, teinté de sang. On excise le nodule et on en pratique l'examen microscopique.

*Aspect du liquide* (frottis colorés au Giemsa) : très nombreux éléments cellulaires, sans microbes visibles. Ces éléments sont, en majorité, des polynucléaires bien conservés, rarement picnotiques. On constate, en outre, de rares lymphocytes et, surtout, des gros mononucléaires à protoplasma basophile et à noyau vésiculeux, pourvu d'un volumineux nucléole. Certains de ces monocytes, dont l'analogie avec ceux décelés dans les ganglions atteints de poradénie expérimentale est frappante, renferment des inclusions (masse chromatique résultant de la pycnose des polynucléaires).

*Aspect microscopique du nodule préputial* : l'épiderme, manifestement épaissi, est constitué par des cellules non vacuolisées, et n'offrant aucune tendance à la vésiculisation. La couche germinative est infiltrée par des lymphocytes et des polynucléaires, que l'on retrouve, d'ailleurs, dans les papilles. En profondeur, les vaisseaux sont très altérés. Souvent oblitérés par suite d'une hypertrophie de leur endothélium en état de multiplication mitotique, ils sont entourés de véritables follicules constitués par des monocytes basophiles, des lymphocytes et des rares cellules plasmatiques.

Il résulte de cet essai que *l'introduction d'une goutte d'émulsion cérébrale virulente sous la muqueuse préputiale du singe est suivie d'une lésion locale apparaissant le treizième jour, et offrant l'aspect d'un petit nodule à tendance ulcéraire. La constitution cytologique de ce nodule rappelle, dans ses grandes lignes, celle de l'accident primitif qui précède l'éclosion de la poradénie inguinale* [cf. Thèse de Phylactos (*loc. cit.*) et Gans (1)]. Rappelons que Hellerström et Wassén (*loc. cit.*) ont provoqué l'adénopathie chez les simiens par simple inoculation de virus lymphogranulomateux dans le prépuce.

(1) GANS. Réunion dermatologique de Strasbourg, 8 mars 1931; *La Presse Médicale*, n° 29, 1931, p. 529.

EXPÉRIENCE XIV. — Le 28 mai, on inocule du virus provenant du *Cynocephalus babuin* n° 342, sacrifié le neuvième jour, dans le prépuce (face externe) et dans la muqueuse périanale du :

*Cynocephalus babuin* n° 325. Le cinquième jour, nous constatons, au point d'inoculation, la présence de deux nodules rouges, violacés, très saillants, situés tout près du sillon balano-préputial. Le lendemain, les nodules



FIG. 21. — *Cynocephalus babuin* 325. Inoculation préputiale. Adénite inguinale bilatérale, quarante-trois jours après l'inoculation.

s'exulcèrent et provoquent un léger phimosis. Rien de particulier au niveau de la muqueuse périanale. Le 8 juin, le ganglion inguinal gauche est tuméfié; quatre jours après, adénite bilatérale, ganglions axillaires palpables. Le 22 juin, énorme adénopathie inguinale, du volume d'un gros œuf de pigeon et adénopathie axillaire (fig. 21). Le nodule préputial s'est résorbé.

Recherche du virus dans les ganglions inguinaux. 1<sup>er</sup> Prélèvement, le trente-

troisième jour. Le ganglion excisé sert à préparer une émulsion qui est inoculée au ;

*Cercopithecus callithrix* n° 388 (le 30 juin). Le treizième jour, l'animal est faible et hésite à se déplacer. Le 14 juillet, parésie généralisée. Sacrifié le quatorzième jour.

*Examen histologique* : lésions très intenses de l'ensemble du névraxe.

2° Prélèvement le quarante-troisième jour. Inoculation au *Cynocephalus* babuin n° 349 (le 10 juillet). Le onzième jour, l'animal montre de l'incoordination des mouvements, des tremblements, un nystagmus vertical et de la

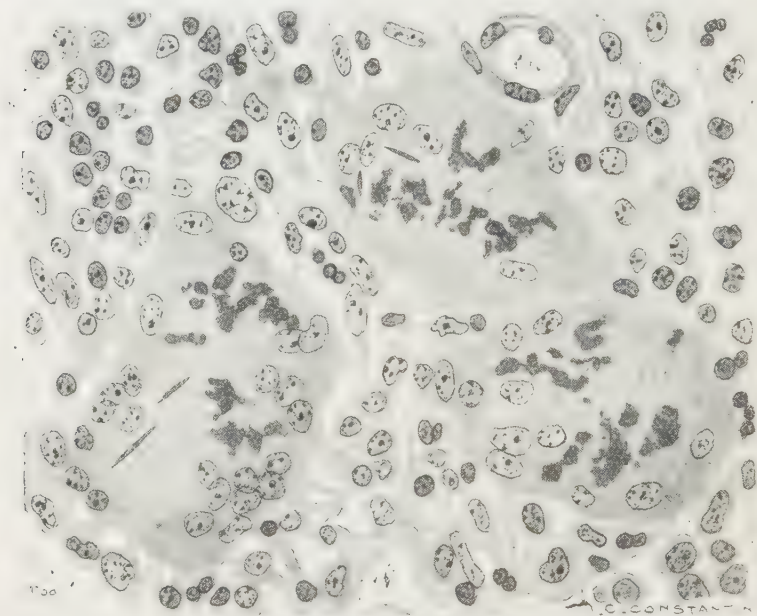


FIG. 22. — *Cynocephalus* babuin 325. Inoculation préputiale. Ganglion inguinal excisé le trente-troisième jour (présence de virus). Trois cellules géantes contenant des formations oxyphiles aciculaires. Unna. Gros. : 700/1.

mydriase. Il est complètement paralysé le quatorzième jour. Agonisant le 25 juillet, il est mort dans la nuit.

*Examen histologique* : lésions très accusées des méninges cérébrales.

*Examen microscopique du ganglion prélevé le trente-troisième jour.* La coupe montre les mêmes altérations que celles décrites ci-dessus et, en plus, de véritables *plasmodes*, pourvus de 10 à 15 noyaux centraux ou périphériques. Ces plasmodes contiennent, dans leur cytoplasma, des masses chromatiques, lesquelles se résolvent en des formations aciculaires, franchement oxyphiles (Cf., figure 22).

*Cette expérience, comparable à la précédente, montre que l'inoculation intrapréputiale du virus lymphogranulomateux déter-*



*mine un accident local d'aspect nodulaire, à tendance ulcéralive, spontanément résorbable, et suivi d'une polyadénie inguinale et axillaire. Les ganglions tuméfiés de l'aine renferment le germe de la maladie de Nicolas et Favre, le trente-troisième et le quarante-troisième jour après l'inoculation (1).*

*Conclusions.* — Cette étude permet de formuler les conclusions suivantes :

*Les voies les plus propices à la pénétration du virus dans l'organisme du singe sont l'encéphale (inoculation transcrânienne), le prépuce et les ganglions lymphatiques de l'aine, la voie préputiale étant celle qui correspond au mode de propagation de la maladie humaine. Si l'inoculation intracrânienne est suivie de méningo-encéphalite généralisée, par contre, l'introduction du virus sous la muqueuse préputiale, ou dans les ganglions de l'aine, épargne l'axe cérébro-spinal. Elle n'est suivie que d'une paradenie avec présence de virus dans les masses ganglionnaires hypertrophiées (de trente et un jours à quarante-trois jours, au moins). Le germe de la maladie de Nicolas et Favre ne réalise pas le phénomène de la NEUROPROBASIE (Levaditi) et n'offre pas d'affinités cornéotropes comparables à celles du virus herpéto-encéphalitique.*

## CHAPITRE VIII

### RÉPARTITION DU VIRUS DANS L'ORGANISME DU SINGE

Nous avons étudié la répartition du virus lymphogranulomateux dans l'organisme des singes contaminés expérimentalement. Il importait, en effet, de savoir si le germe se localise exclusivement dans le système lymphatique des régions en rapport avec le point d'inoculation, ou bien s'il se généralise. En d'autres termes, il nous fallait préciser si la maladie de Nicolas et Favre est une infection intéressant l'ensemble de

(1) Nous avons inoculé un babouin par voie intrapéritonéale, sans que l'animal ait paru réagir jusqu'ici. Cependant, Hellerström et Wassén (août 1931, *loc. cit.*) ont démontré récemment que le singe peut être infecté par voie intrapéritonéale, et que l'exsudat péritonéal renferme des quantités élevées de virus.

l'organisme, ou un processus limité aux ganglions ou au névraxe, suivant que l'inoculation a eu lieu par voie intraganglionnaire ou transcranienne. Voici les résultats de nos essais expérimentaux :

a) VIRULENCE DU CERVEAU ET DU LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN. — Nous avons montré précédemment que le *cerveau* des simiens inoculés par la voie intranévraxique est constamment virulent. Il en est de même du liquide céphalo-rachidien, témoin l'expérience suivante :

EXPÉRIENCE XV. — Le *Cynocephalus babuin* n° 363 est inoculé, par voie transcranienne, le 5 juin 1931. Il est sacrifié le dixième jour (lésions positives). Peu avant la mort, on pratique une ponction sous occipitale et on recueille un liquide céphalo-rachidien trouble, contenant 600 lymphocytes par millimètre cube. Ce liquide est inoculé dans le cerveau du :

*Cynocephalus babuin* n° 369, le 16 juin 1931. Le sixième jour, l'animal montre de la raideur des membres, du ptosis de la paupière droite et du nystagmus. Le 26 juin, on note de l'incoordination des mouvements et une parésie des membres supérieurs. Le 4 juillet, paralysie complète du bras droit. Mourant le 6 juillet, il est sacrifié le vingtième jour.

*Examen microscopique* : altérations caractéristiques intenses du névraxe.

*Le liquide céphalo-rachidien des singes inoculés par voie intracérébrale renferme le virus lymphogranulomateux.*

#### b) VIRULENCE DU SANG ET DES ORGANES (1).

EXPÉRIENCE XVI. — Le *Cercopithecus callithrix* n° 377, inoculé par voie transcranienne le 4 mai 1931, meurt avec des lésions névraxiques intenses le quatorzième jour. On prélève le sang du cœur (culture stérile) et les organes; ceux-ci se montrent dépourvus de germe d'association. Ils servent à préparer des émulsions qui sont injectées dans le cerveau de plusieurs singes. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

TABEAU VI. — Virulence du sang et des organes  
du *Cercopithecus callithrix* n° 317.

MATÉRIEL INOCULÉ	SINGE INOCULÉ	SORT DE L'ANIMAL	LÉSIONS névraxiques	RÉSULTATS
Cerveau . . . . .	<i>Cynocephalus babuin</i> 342.	Sacrifié le 9 <sup>e</sup> j.	Lés. intenses.	Positif.
Foie . . . . .	<i>Cynocephalus babuin</i> 343.	Sacrifié le 20 <sup>e</sup> j.	Lés. intenses.	Positif.
Rate . . . . .	<i>Cynocephalus babuin</i> 344.	Sacrifié le 23 <sup>e</sup> j.	Lés. intenses.	Positif.
Reins . . . . .	<i>Cynocephalus babuin</i> 345.	Sacrifié le 23 <sup>e</sup> j.	Lés. intenses.	Positif.
Ganglion inguinal.	<i>Cynocephalus babuin</i> 347.	Sacrifié le 25 <sup>e</sup> j.	Lés. manifestes.	Positif.
Moelle osseuse. . .	<i>Cynocephalus babuin</i> 348.	Mort le 15 <sup>e</sup> j.	Lés. intenses.	Positif.
Sang du cœur. . .	<i>Cynocephalus babuin</i> 346.	Sacrifié le 23 <sup>e</sup> j.	Absence de lésions.	Négatif.

(1) LEVADITI, RAVAUT, LÉPINE et M<sup>lle</sup> SCHOEN. *C. R. Soc. de Biol.*, 107, 1931, p. 959.

Voici, d'ailleurs, les protocoles détaillés des expériences résumées dans ce tableau :

1° *Encéphale du Callithrix* n° 317, inoculé au *Cynocephalus babuin* n° 342 (onzième passage). L'animal devient malade le 25 mai, présente des troubles d'incoordination le 26, est paralysé le 27; il est sacrifié agonisant le 28 mai (neuvième jour). Son liquide céphalo-rachidien, stérile, contient plus de 250 éléments figurés par millimètre cube. Son encéphale est le siège d'altérations des plus typiques et des plus intenses.

2° *Sang* inoculé (1 c. c. 3, voie intracérébrale) au *Cynocephalus babuin* n° 346. L'animal ne réagit pas à la suite de l'inoculation et reste en bonne santé. Il est sacrifié le vingt-troisième jour. L'examen histologique, pratiqué sur la moelle et les différents segments de l'encéphale, ne révèle aucune lésion.

3° *Foie*, inoculé au *Cynocephalus babuin* n° 343, qui devient malade le 26 mai, présente progressivement les symptômes les plus typiques et meurt paralysé le 8 juin (vingtième jour). Son encéphale présente des lésions intenses de méningite de la corticalité, de la base et des septums, avec formations lymphoïdes péri-vasculaires. Les mêmes lésions typiques se retrouvent à tous les niveaux du névraxe.

4° *Rate*, inoculée au *Cynocephalus babuin* n° 344, qui présente, le 26 mai, une incoordination motrice évoluant progressivement. L'animal, paralysé, est sacrifié le 11 juin (vingt-troisième jour). Tout son névraxe présente des altérations intenses et typiques, ainsi qu'une formation de lymphomes péri-vasculaires.

5° *Moelle osseuse*, inoculée au *Cynocephalus babuin* n° 348, qui succombe le quinzième jour, après avoir présenté un tableau clinique particulièrement complet, et dont le névraxe offre, à l'examen histologique, des altérations généralisées.

6° *Ganglion lymphatique inguinal*, inoculé au *Cynocephalus babuin* n° 347. L'animal résiste à l'inoculation et paraît rester en bonne santé. Il est sacrifié le vingtième jour. L'examen histologique de son encéphale montre la présence de lésions généralisées de méningite, particulièrement intenses au niveau de l'écorce cérébrale postérieure et de la moelle, où les altérations s'accompagnent de formation de lymphomes périvasculaires.

7° *Rein*, inoculé au *Cynocephalus babuin* n° 345. L'animal, malade le 28 mai, présente des troubles parétiques musculaires avec raideur, incoordination et steppage. Il est sacrifié le 11 juin (vingt-troisième jour). Son névraxe présente des altérations histologiques typiques.

Ces résultats mettent en lumière un contraste frappant entre la virulence manifeste de tous les organes examinés et l'absence de virus dans le sang, prélevé au moment de la mort, soit quatorze jours après l'inoculation intracérébrale. L'affinité élective du virus lymphogranulomateux pour le système lymphoïde explique la virulence de la rate, de la moelle osseuse, des ganglions lymphatiques, et, jusqu'à un certain point, celle du foie, lequel, chez le singe, contient

des ébauches de formations lymphoïdes. Par ailleurs, la présence du germe dans le rein soulève la question de l'élimination possible du virus par cet organe, question que d'autres expériences auront à résoudre (1). Remarquons, enfin, que si les résultats négatifs de l'inoculation du sang tendent à prouver l'absence du virus dans ce milieu, il n'en est pas moins vrai que ni l'évolution clinique de la maladie, ni l'examen histologique ne nous permettent de préciser, avec toute l'exactitude désirable, la quantité réelle de virus contenu dans le matériel inoculé. Ce que nous savons de l'inégale réceptivité du singe à l'égard de l'ultravirus lymphogranulomateux, en particulier de la possibilité des formes asymptomatiques, ne nous autorise pas à formuler des conclusions définitives quant à la richesse en virus des différents organes.

*Conclusions. — Chez le singe inoculé par voie intracérébrale avec le virus de la lymphogranulomatose inguinale, ce virus ne reste pas confiné dans le névraxe. Le foie, la rate, le rein, la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques, prélevés au moment de la mort, se montrent virulents. Par contre, le sang, examiné au même moment, ne paraît pas contenir une quantité suffisante de germes pour conférer la maladie aux simiens réceptifs.*

Toutefois, d'après les expériences récentes de Hellerström et Wassén (août 1931), le sang peut, chez certains simiens, conférer la maladie à d'autres animaux de la même espèce.

Quoi qu'il en soit, l'ensemble de ces constatations confirment les observations recueillies par l'un de nous (Ravaut), en collaboration avec Boulin et Rabeau (2), au sujet d'une « variété de poradénolymphite suppurée bénigne à forme septicémique, dans ses rapports avec la maladie de Nicolas et Favre ». Voici comment les auteurs s'exprimaient en 1922, au sujet de leurs observations cliniques et histopathologiques :

« En résumé, comme M. le professeur Nicolas et ses élèves, nous avons constaté au niveau des aines l'existence d'adéno-

(1) Un essai de transmission de la maladie de Nicolas et Favre au moyen de l'urine d'un singe infecté nous a donné un résultat négatif.

(2) RAVAUT, BOULIN et RABEAU. *La Presse Méd.*, n° 42, 27 mai 1922, p. 453; *Ann. de Dermat. et de Syphil.*, 5, 1924, p. 463.



pathies spéciales, à porte d'entrée génitale, à évolution sub-aiguë, suppurant et se fistulisant presque toujours. Mais nous pensons, en outre, que cette affection dépasse fréquemment la limite des ganglions inguinaux, et revêt, par les phénomènes fébriles qui l'accompagnent, l'extension à d'autres ganglions, les poussées successives, les rechutes éloignées, les modifications de la formule et des réactions sanguines, etc., l'allure d'une véritable maladie générale, étendue à tout le système lymphopoiétique. Elle affecte des formes d'intensités diverses, malgré sa chronicité. Elle nous a toujours paru évoluer d'une façon bénigne, bien qu'il n'y ait pas plus de seize mois que nous suivions notre premier malade. En outre, à notre avis, il ne s'agit pas d'une infection uniquement limitée aux ganglions de l'aîne, et nous pensons que certaines adénopathies cervicales, trop facilement étiquetées tuberculeuses ou scrofuleuses, appartiennent à ce groupe. En tout cas, chez plusieurs malades, nous avons constaté, à la suite de maux de gorge persistants, l'apparition d'adénopathies cervicales dont l'origine tuberculeuse ne put être prouvée, et qui guérissent par l'emploi de l'iode et de l'émétine. Peut-être même d'autres adénopathies rentrent-elles dans le même groupe. »

*Il est évident que nos recherches expérimentales, démontrant la généralisation du virus lymphogranulomateux chez le singe inoculé par voie intracérébrale, apportent une confirmation éclatante aux constatations faites chez l'homme par Ravaut et ses collaborateurs.*

## CHAPITRE IX

### IMMUNITÉ, VACCINATION, POUVOIR VIRULICIDE DU SÉRUM

Nous avons réalisé un certain nombre d'essais afin de préciser :

- 1° *Si les singes ayant survécu à l'infection expérimentale acquièrent de ce fait l'état réfractaire ;*
- 2° *S'il est possible de vacciner activement les simiens par des injections sous-cutanées répétées d'émulsions virulentes ;*
- 3° *Quelles sont les propriétés virulicides du sérum des singes*

*vaccinés et des sujets humains atteints de la maladie de Nicolas et Favre.*

Examinons chacun de ces problèmes :

#### 1° ETAT RÉFRACTAIRE ACQUIS.

EXPÉRIENCE XVII. — Nous nous sommes servi du *Cynocephalus babuin* n° 307, inoculé par voie intraoculaire et intraganglionnaire, dont nous avons résumé l'observation page 73. *L'animal a été éprouvé par inoculation intracérébrale* le 15 juillet 1931 (le 113<sup>e</sup> jour; virus du Cynocéphale n° 388, sacrifié le 14<sup>e</sup> jour). Le singe 307, bien portant, n'ayant réagi par aucun signe visible, est sacrifié le 17 août, soit le 33<sup>e</sup> jour.

*Examen microscopique* : Altérations méningées très discrètes (lymphocylose).

*Cette expérience prouve qu'un animal, ayant survécu cent treize jours à une inoculation positive intraoculaire et intraganglionnaire de virus lymphogranulomateux, paraît avoir acquis un état réfractaire, sinon absolu, du moins assez manifeste à l'égard d'une infection d'épreuve pratiquée par voie transcranienne.*

2° IMMUSATION ACTIVE. — Plusieurs singes ont reçu de nombreuses injections d'émulsions cérébrales virulentes sous la peau. Ils ont été, par la suite, éprouvés par inoculation de virus dans le névraxe. Voici l'observation détaillée de deux d'entre eux :

EXPÉRIENCE XVIII. — *Macacus rhesus* n° 155, reçoit, du 19 mars au 5 mai, 10 injections sous-cutanées de 5 cent. cubes d'émulsion virulente fraîche. Le 12 mai, on recueille 40 cent. cubes de sang dans la carotide, afin de préparer un sérum dont on éprouvera le pouvoir virulicide (v. page 85).

Le 15 mai, soit dix jours après la dernière injection sous-cutanée, l'animal est éprouvé par inoculation transcranienne de virus provenant du *Cynocephalus babuin* n° 318, sacrifié le onzième jour. Six jours après, le singe est pris de violents tremblements, sa démarche est difficile. Ptosis de l'œil gauche. Le 25 mai, on note une parésie des quatre membres et des cris répétés. Mort le neuvième jour. Cultures du cerveau et du sang du cœur : *négatives.*

EXAMEN HISTOLOGIQUE. — Lésions discrètes au niveau de l'écorce antérieure, avec formation de petits lymphomes périvasculaires.

*Ecorce postérieure* : Altérations intenses des septums, mêmes modifications dans la corne d'Ammon et la protubérance.

EXPÉRIENCE XIX. — Le *Cynocephalus babuin* n° 332 reçoit, du 15 mai au 10 juillet, 13 injections d'émulsions névraxiques virulentes fraîches. Le 13 juillet,

soit cinq jours après la dernière injection, il est éprouvé par inoculation transcranienne de virus provenant du *Cercopithecus callithrix* n° 388, sacrifié le quatorzième jour. Aucun trouble morbide apparent jusqu'au 17 août, date à laquelle le singe est sacrifié (quatre-vingt-treize jours après le début de la vaccination, et trente-deux jours après l'inoculation d'épreuve). Cultures du sang du cœur et du cerveau : *négatives*.

EXAMEN HISTOLOGIQUE : Au niveau de l'écorce antérieure et de la base du cerveau, lésions manifestes, quoique d'intensité assez faible (légère méningite monocytaire et petits lymphomes périvasculaires).

Ces deux expériences montrent qu'il est difficile de conférer au singe une immunité absolue à l'égard de l'épreuve intracérébrale, si on lui injecte à plusieurs reprises du virus frais dans le tissu cellulaire sous-cutané. Nous verrons, cependant, que malgré l'état réfractaire partiel du Cynocéphale n° 332, son sérum jouissait de propriétés virulicides manifestes.

3° PROPRIÉTÉS VIRULICIDES DU SÉRUM SANGUIN. — Nous avons recherché si le sérum sanguin des singes malades ou vaccinés par des injections répétées de virus sous la peau, de même que le sérum d'un mouton préparé de la même manière, possédaient des propriétés virulicides apparaissant *in vitro*. Des expériences analogues ont été réalisées avec le sérum d'un sujet atteint de *lymphogranulomatose inguinale*, par comparaison avec le sérum d'un malade porteur d'adénites chancrelles et d'un individu normal. Voici la *technique* utilisée :

Une émulsion névraxique virulente, clarifiée par sédimentation, est mélangée, à volumes égaux, avec le sérum à examiner. Le mélange est maintenu pendant une heure trente minutes à 37°, et pendant dix-neuf à vingt heures à la glacière. Sa virulence est éprouvée par inoculation transcranienne pratiquée au singe (1 cent. cube).

#### SÉRUMS UTILISÉS :

1° Sérum du *Cynocephalus babuin* n° 334, atteint d'une forme chronique, lentement évolutive, de la maladie de Nicolas et Favre expérimentale. L'animal, inoculé par voie intracérébrale le 16 mai, a montré de l'incoordination des mouvements, de l'opisthotonos, une abolition des réflexes pupillaires et une atonie musculaire. Il est mort le trente-deuxième jour ; saignée le trentième jour ;

2° Sérum de singes vaccinés. Il s'agit du *Macacus rhesus* n° 155

(V. expérience XVIII) et du *Cynocephalus babuin* n° 332 (V. expérience XIX). tous deux préparés par des injections sous-cutanées de virus frais ;

3° *Sérum de mouton vacciné*. Le donneur a reçu, du 10 mars au 16 mai, 13 injections sous-cutanées de virus frais (5 cent. cubes) :

4° *Sérum de malade atteint de lymphogranulomatose inguinale*. Malade Coll... (Georges), de l'observation VII (v. page 38) ; la saignée a eu lieu le 15 mai ;

5° *Sérum de malade atteint de bubon chancrelleux*. Malade Coll... (Gabriel). Bubon et chancre. Réaction au Dmelcos positive, inoculation au singe négative (v. page 42).

Les résultats de ces essais de neutralisation sont consignés dans le tableau ci-joint.

TABLEAU VII. — Pouvoir virulicide du sérum sanguin.

ORIGINE DU SÉRUM	INOCULATION AU	SORT de l'animal	EXAMEN histologique	RÉSULTATS de la neutrali- sation
Singe 334. Forme évolutive . . .	<i>Cynocephalus babuin</i> 374.	Sacr. le 16 <sup>e</sup> j.	Lés. intenses	Négatif.
Singe 155, vacciné sans succès. . .	<i>Cynocephalus babuin</i> 335.	Mort le 19 <sup>e</sup> j	Lés. intenses.	Négatif.
Singe 332, vacciné partiellement .	<i>Cercopithecus callithrix</i> 387.	Sacr. le 31 <sup>e</sup> j.	Absence de lésions	Positif.
Mouton vacciné .	<i>Cynocephalus babuin</i> 333.	Sacr. le 32 <sup>e</sup> j.	Lés. manifestes.	Négatif.
Mouton normal .	<i>Cynocephalus babuin</i> 334.	Sacr. le 32 <sup>e</sup> j.	Lés. intenses	Négatif.
Malade (Favre et Nicolas) . . . .	<i>Cynocephalus babuin</i> 335.	Sacr. le 32 <sup>e</sup> j. (n'a jamais été malade).	Lés. à l'état de trace.	Positif.
Malade (bubon chancrelleux). . . .	<i>Cynocephalus babuin</i> 337.	Sacr. le 27 <sup>e</sup> j.	Lés. intenses.	Négatif.
Homme normal .	<i>Cynocephalus babuin</i> 338.	Sacr. le 34 <sup>e</sup> j.	Lés. manifestes.	Négatif.

Cette expérience montre que parmi tous les sérums dont nous avons éprouvé les propriétés virulicides, les seuls qui aient neutralisé *in vitro* le virus lymphogranulomateux ont été : 1° *Le sérum d'un singe partiellement immunisé* par des injections sous-cutanées de virus frais (n° 332), et, 2° *le sérum d'un sujet atteint de la maladie de Nicolas et Favre* (alors que le sérum d'un autre malade porteur d'adénites chancrelleuses et le sérum humain normal ont été sans action).



Il y a donc lieu de conclure qu'au cours de l'évolution de la lymphogranulomatose inguinale humaine le sérum s'enrichit en principes virulicides. Reste à préciser le moment où des principes apparaissent dans le sang, en quelle quantité, quelle peut être leur utilisation dans la thérapeutique (traitement par le sérum de convalescents ou de sujets guéris), etc... Ce sont là des problèmes que nous nous proposons d'étudier ultérieurement.

Ajoutons que tous nos essais de *réaction de fixation du complément* (procédé classique, ou méthode de Calmette et Massol), réalisés soit avec le sérum de sujets atteints de lymphogranulomatose inguinale, soit avec le sérum de singes malades ou vaccinés, n'ont fourni, jusqu'à présent, que des résultats négatifs.

*Conclusions.* — Ces études préliminaires sur l'immunité dans la maladie de Nicolas et Favre expérimentale autorisent les conclusions suivantes :

*Les singes qui survivent à une inoculation de virus par la voie intraganglionnaire acquièrent un état réfractaire, sinon absolu, du moins assez manifeste à l'égard de l'épreuve intracérébrale. Il est difficile de vacciner les simiens par des injections sous-cutanées de virus lymphogranulomateux frais. Le sérum des sujets humains atteints depuis un certain temps de la maladie de Nicolas et Favre neutralise in vitro l'agent pathogène de cette maladie.*

\*  
\* \*

Nous avons, à la fin de chacun des chapitres de ce Mémoire, formulé les conclusions qui s'en dégagent. L'ensemble de ces conclusions nous permet d'affirmer que, conformément à l'opinion émise par Hellerström et Wassén, la maladie de Nicolas et Favre reconnaît, comme agent étiologique, un virus filtrable spécifique, LE VIRUS LYMPHOGRANULOMATEUX. La méthode des inoculations intracérébrales a ouvert la voie à des recherches expérimentales dont l'importance est hors conteste. Nous sommes heureux d'avoir apporté une contribution personnelle à l'étude du problème, si intéressant, et, il y a à peine un an, si controversé, de la spécificité étiologique de la lymphogranulomatose inguinale.

\*  
\*  
\*

Nos expériences, fort onéreuses du fait qu'elles ont nécessité l'emploi de très nombreux singes, n'ont pu être effectuées que grâce à l'appui de l'*Institut Pasteur*, du *Ministère de la Santé Publique* (dont le Directeur du *Service de la prophylaxie anti-vénérienne*, M. le Dr Cavaillon, nous est venu en aide), et de la bourse accordée à notre Laboratoire par M. le Baron Henri de Rothschild. Nous les prions d'accepter nos plus vifs remerciements.

#### LÉGENDE DE LA PLANCHE IV

FIG. 1. — *Macacus cynomolgus* 161. Inoculation intra-cérébrale. Mort le septième jour. Ecorce postérieure. Méninge des septums. Deux gros monocytes basophiles avec nucléole hyperchromatique, entourés de mononucléaires, de lymphocytes et de cellules plasmatiques. Coloration au Giemsa. Gross. : 700/1.

FIG. 2. — *Cynocephalus babuin* 307. Inoculation intra-ganglionnaire. Ganglion virulent excisé le trente et unième jour. Vaisseau dont les endothéliums sont hypertrophiés et en état de prolifération. Ce vaisseau est entouré de gros monocytes basophiles à noyau hyperchromatique et dont deux sont en état de mitose. Lymphocytes et cellules plasmatiques. Coloration au Mann. Gross. : 700/1.

FIG. 3. — *Macacus cynomolgus* 161. (Voir fig. 1). Ecorce antérieure, méninges. Deux vaisseaux sont entourés de rares polynucléaires, de lymphocytes, de cellules plasmatiques et d'éléments fusiformes offrant l'aspect des fibroblastes. Coloration au Giemsa. Gross. : 700/1.

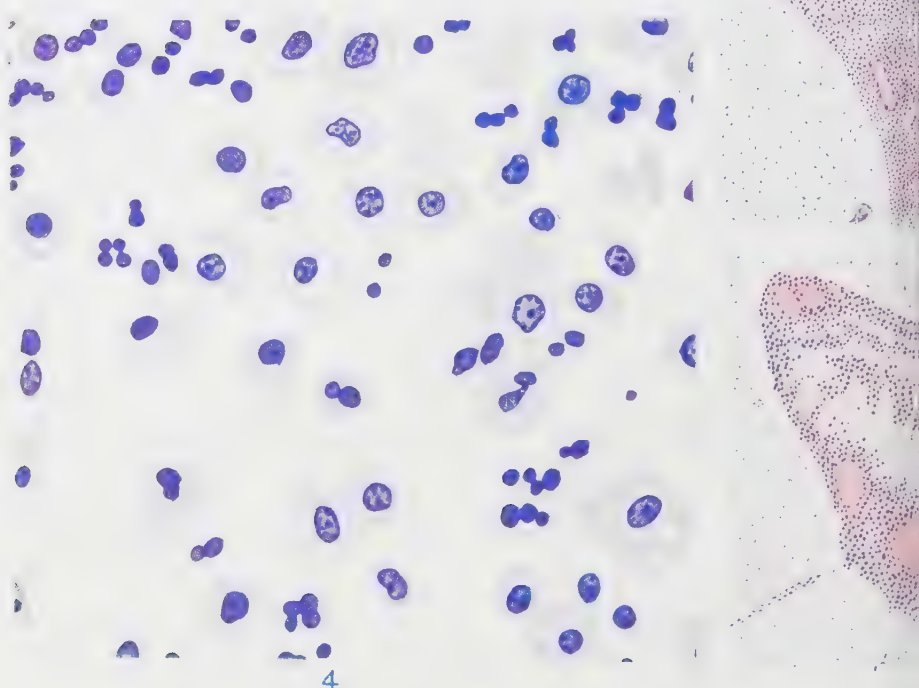
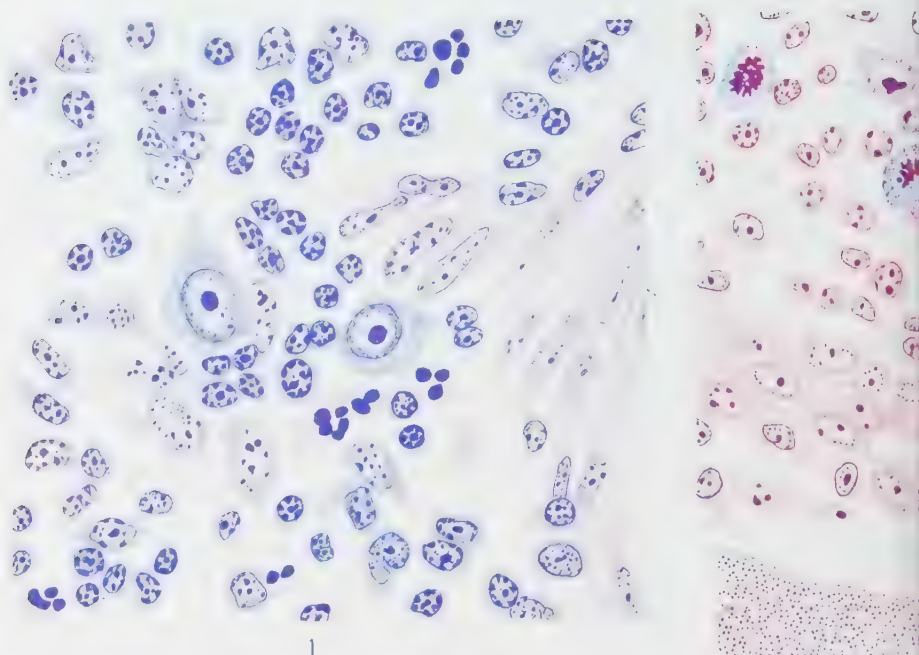
FIG. 4. — *Macacus cynomolgus* 238. Inoculation intracérébrale. Mort le huitième jour. Méninge de l'écorce antérieure. Infiltration par des polynucléaires, des monocytes et des gros éléments ayant l'aspect de cellules granulo-adipeuses. Hémalun. Gross. : 700/1.

FIG. 5. — *Macacus cynomolgus* 238. (Voir fig. 4). Ecorce postérieure. Lésions de méningite. Coloration au Giemsa. Gross. : 100/1.

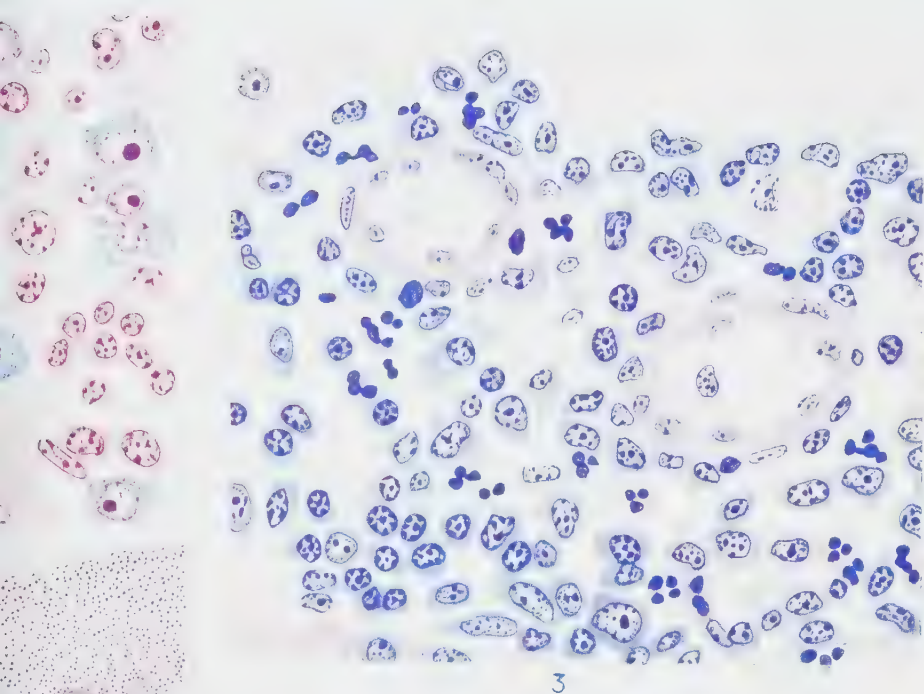
FIG. 6. — *Macacus cynomolgus* 161. (Voir fig. 1). Ecorce postérieure. Altérations des méninges septales. Coloration au Giemsa. Gross. : 100/1.

FIG. 7. — *Macacus cynomolgus* 238. (Voir fig. 4). Ecorce antérieure. Éléments monocytaires dans les méninges septales. La chromatine nucléaire se concentre sur la paroi du noyau et sur le bord du cytoplasme. Hémalun. Gross. : 700/1.









3



7



# ÉTUDES SUR LA MICROBIOLOGIE DU SOL

(CINQUIÈME MÉMOIRE)

## ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DU SOL, PRINCIPES D'UNE NOUVELLE MÉTHODE

par S. WINOGRADSKY.

[PLANCHES I, II et III].

Clichés de M. Jeantet, microphotographe de l'Institut Pasteur.

Rappelons, comme entrée en matière, les méthodes en cours pour déterminer les fonctions, la densité et l'activité de la population microbienne du sol, qui sont à la base de l'activité chimique de ce milieu naturel.

En premier lieu, tant au point de vue de son ancienneté que de sa popularité, c'est la méthode des plaques qui doit être mentionnée. Elle a rendu de bons services dans la détermination de la pollution des eaux, et elle continue à servir ce but avec utilité jusqu'à ce jour. L'école de Koch, à laquelle on doit la méthode, la crut applicable aussi bien à l'étude de la population microbienne du sol, mais ceci ne s'explique que par le manque de connaissances sur les caractères de cette population à cette époque déjà éloignée : on n'avait encore aucune idée sur la différenciation physiologique dans le monde des microbes et on ne voyait, par conséquent, aucune raison pour que toutes les espèces, des bactéries notamment, ne puissent s'accommoder d'un seul et même milieu, rendu aussi « nutritif » que possible par l'abondance de matières protéiques.

La méthode a eu certainement le mérite de permettre un isolement facile de nombreuses espèces, mais toutes ces formes isolées en culture pure sur bouillon, gélatine ou gélose ne présentaient aucun rapport saisissable avec les processus qui se déroulent dans le milieu naturel.

C'est la *méthode élective*, comme on le sait, qui a dévoilé la diversité des fonctions des microbes et qui a permis d'isoler les agents des phénomènes les plus caractéristiques dont le sol est le siège : nitrification et nitrification, oxydation du soufre et d'autres corps inorganiques oxydables, fixation de l'azote gazeux, décomposition de la cellulose, des substances pectiques, pour ne nommer que les plus intéressants. Il apparut alors que tous ces agents sans exception sont réfractaires à la méthode des plaques ne paraissant jamais sur les milieux standard. On a cru pourtant devoir la conserver pour déterminer les soi-disant nombres totaux (*total numbers*) des germes, à côté d'expériences spéciales destinées à l'évaluation des pouvoirs nitrificateur, fixateur, ammonificateur et autres activités chimiques du sol. Il est évident donc que les totaux fournis par la méthode ne s'appuyaient que sur une convention qui paraissait peu logique du moment que les germes les plus intéressants du sol en étaient notoirement exclus. Malgré la contradiction, la méthode resta très largement en usage pour la raison, comme nous le croyons, que les agrobiologistes tenaient à une méthode simple et rapide pour juger *en bloc* de l'activité microbienne d'un sol donné : les nombres des colonies sur plaques étaient censés en donner la mesure.

A dire vrai, la méthode ne nous paraît pas avoir mérité la vogue dont elle jouit dans les études microbiennes du sol. Les chiffres que fournit le dénombrement sont assez généralement interprétés comme l'expression de la densité et de l'activité des germes d'un sol donné. Certes, la densité est en rapport avec l'activité, mais pour en juger il est avant tout nécessaire d'identifier tant la pullulation que le genre d'activité : à une nitrification plus intense correspondrait, par exemple, un nombre plus élevé de germes spécifiques; à une fixation plus intense, plus d'*Azotobacters*, et ainsi de suite. Or, dans le cas qui nous intéresse, aucune conclusion de ce genre n'est possible, pour la simple raison que l'on ignore tout du groupe hétéroclite quelconque qui apparaît sur tel ou tel milieu standard. Bien plus, il n'est même pas permis d'attribuer à ces germes, dociles à la culture sur milieu artificiel, un état actif au sein du sol, car aussi bien les colonies peuvent provenir de germes à l'état inactif. Il est vrai, d'un autre côté, que même à cet état les

germes représentent une activité potentielle, mais le vague de ces indications ne permet tout de même pas de compter sur la méthode comme moyen d'étudier avec quelque précision les activités dont il s'agit.

Le caractère conventionnel de la méthode apparaît encore plus flagrant, si l'on compare les chiffres obtenus par la méthode des plaques avec ceux constatés au moyen de l'examen microscopique direct du sol. Cet examen a révélé, comme on le sait, que les *nombre*s réels dans les sols arables sont souvent de l'ordre de un à plusieurs milliards par gramme, tandis que les totaux des plaques standard n'atteignent que 50 à 100 millions au maximum. Il ne s'agit donc là que d'une petite partie, ne comprenant que 10 à 5 p. 100, parfois encore moins, de la population totale. Ce fait, solidement établi par des recherches déjà assez nombreuses, paraît surtout de nature à réduire les conclusions établies par la méthode des plaques à leurs justes proportions.

Voici, par exemple, les recherches bien connues de Rothamsted, exécutées par MM. Cutler, Crump et Sandon (1) : numération des germes sur une seule et même parcelle durant toute une année en se servant de la gélose mannite-asparagine, avec le résultat que les nombres, variables du jour au lendemain, étaient inversement proportionnels aux nombres des protozoaires présents, dénombrés simultanément. Le fait est intéressant, mais il serait bien hasardeux d'attribuer aux protozoaires le pouvoir de limiter les pullulations microbiennes et d'exercer ainsi une influence sérieuse sur l'activité du sol, les expériences n'ayant trait qu'à une petite partie de cette population, sans savoir encore de quelle activité il s'agit dans le cas.

La même mise au point est désirable en ce qui se rapporte aux expériences de MM. Thornton et Gray (2) sur les fluctuations des nombres des colonies durant les vingt-quatre heures, étudiées au moyen de numérations exécutées toutes les deux

(1) A quantitative investigation of the bacterial and protozoan population of the soil. *Philos. Trans. R. S.*, London. Série B, vol. CCXI, 1922, p. 317-350.

(2) The fluctuations of bacterial numbers, etc. *Proceedings. R. S.*, London, B. vol. CVI, 1930, p. 399-417.



heures. Ces fluctuations éveillent tout naturellement l'idée d'un mouvement incessant; elles paraissent fournir une preuve que les germes dont il s'agit sont réellement à l'état actif au sein du sol, et non à l'état de repos. Or, ceci n'est guère prouvé pour les bactéries, microbes essentiellement actifs, car les dénombrements comprenaient les colonies de ces dernières en même temps que celles des actinomycètes: les fluctuations pouvaient donc être dues à la fragmentation de leurs mycéliums en conidies, ou oidies, ce qui ne permet pas de conclure à une oscillation sérieuse de l'activité microbienne, ces organismes étant les moins actifs dans le sol; d'autant plus que les oscillations reflétées par les dénombrements sont trop insignifiantes par rapport à la population totale *réelle* pour leur attribuer un effet sensible.

Loin de nous la pensée de juger la méthode des plaques inutile; nous entendons précisément le dénombrement des colonies sur plaques de gélose à formule conventionnelle, que ce soit celle de Waksman (albumine-agar) ou de Thornton (mannite-asparagine-agar). On conçoit qu'une différence importante dans les chiffres obtenus, même si elle ne se rapporte qu'à une partie restreinte de la population totale, peut être envisagée comme un indice que le milieu sol est plus ou moins favorable aux pullulations microbiennes en général, ce qui dépend évidemment de l'apport de matière énergétique. Inutile de dire que l'apport des germes du dehors y joue également un grand rôle. Le fumier de ferme en apporte des quantités vraiment immenses, des spores bacillaires surtout, ce dont il est bien facile de s'assurer au moyen de l'examen microscopique direct; ces spores ne germent que rarement dans un sol arable normal, mais elles donnent toujours lieu à de nombreuses colonies sur plaques. Il est donc banal de prévoir qu'un sol fumé donnera des chiffres plus élevés qu'un sol non fumé; d'un autre côté, un sol fumé donnera de meilleures récoltes. Il y aura donc coïncidence entre les chiffres plus élevés et les meilleures récoltes, laquelle n'apprendra pourtant à l'agrobiologiste rien qu'il ne sache, et ne lui dévoilera pas le moins du monde les activités multiples des agents qui y ont joué un rôle. En somme, la méthode ne lui donnerait qu'un moyen facile de diagnostiquer une terre fumée d'une terre non fumée.

Il est douteux que l'on ait besoin de cette indication dans la pratique agricole.

Avant d'abandonner ce sujet, mentionnons l'appréciation de Waksman (1) comme exemple d'une opinion tout opposée à la nôtre. Impressionné particulièrement par la coïncidence entre chiffres microbiens et fertilité, que nous venons de citer, cette autorité va jusqu'à affirmer, dans une récente publication ayant pour thème les progrès de la Microbiologie du sol, qu'en dépit de toutes les critiques formulées contre elle, la méthode donne un très bon tableau de toute la flore du sol et qu'elle peut servir de mesure pour les états microbiologiques d'un sol donné [*dass die Plattenmethode... ein ganz gutes Bild der gesamten bakteriellen, Aktinomycceten und Pilzflora des Bodens gibt und dass sie als Masstab für die mikrobiologischen Verhältnisse im Boden dienen Kann* (l. c., p. 16)<sup>1</sup>. L'auteur rend donc une minorité, changeante et de nature imprécise, responsable de la microflore entière comprenant les trois familles. L'opinion paraît audacieuse, car on ne voit pas sur quelles données expérimentales — en dehors de celles que nous venons de mentionner et dont la valeur est douteuse — on pourrait l'étayer. Il est clair d'autre part que, les conditions d'existence des différents groupes des microbes du sol étant souvent antagonistes, l'emploi d'un milieu standard universel ne peut conduire qu'à des illusions si on ne lui reconnaît pas expressément un caractère conventionnel.

Passons aux opérations destinées spécialement à évaluer les activités microbiennes qui s'exercent au sein du milieu *sol* : l'ammonification, la nitrification, la fixation de l'azote, la décomposition de la cellulose, le dégagement d'acide carbonique. Pour ces expériences, très nombreuses, on se servait tantôt d'une solution appropriée, tantôt de portions de terre d'une centaine de grammes additionnée de substances destinées à subir l'attaque microbienne. Au bout d'une période généralement assez longue (environ trente jours), on déterminait le produit final des processus à l'étude et on jugeait des

(1) Der gegenwärtige Stand der Bodenmikrobiologie, etc. *Fortschritte der naturwissenschaftlichen Forschung, herausgegeben von Abderhalden*. Berlin, 446 p., 1930.

pouvoirs respectifs d'après la quantité des produits — ammoniacque, acide nitrique, azote fixé, etc. — trouvés à l'analyse. Les expériences n'étaient pas accompagnées de recherches microbiologiques au sens propre du mot : les agents des processus n'attiraient aucune observation. Sauf les *Azotobacter* dont la présence était facilement contrôlable, on ne s'en occupait généralement pas. En résumé, ces expériences n'avaient pour but que l'étude de la dynamique chimique du sol et non l'analyse microbiologique, dont l'exigence essentielle est de déterminer avec précision les agents en même temps que les activités et de les mettre l'un et l'autre en rapport de cause à effet.

Ajoutons qu'au point de vue de cette même dynamique, elles restaient bien incomplètes, car elles ne touchaient principalement qu'au cycle d'azote, sans approcher des processus composant le cycle du carbone. En fait de ces derniers, la méthode courante se bornait au dosage de l'acide carbonique dégagé par la population microbienne en bloc, méthode considérée par plusieurs auteurs comme la plus fidèle quand il s'agit de mesurer la dégradation de la substance hydrocarbonée au sein du sol. Mais cette méthode, purement chimique, n'apporte, bien entendu, aucune précision microbiologique.

Sauf quelques procédés rudimentaires pour suivre la dégradation de la cellulose au moyen de morceaux de papier étendus sur la terre ou enfouis, on ne dispose encore d'aucune méthode pour étudier les agents de la décomposition d'un nombre immense de substances d'origine animale ou végétale. On sait que toutes les substances organiques de cette origine sont attaquées dans le sol et y sont détruites. Quels sont les agents de cette attaque? Certes, les espèces auxquelles on pourrait l'attribuer ne manquent pas dans le milieu naturel, à en juger par leur conduite en culture pure, et c'est là la seule réponse que pourrait donner la microbiologie générale à la question posée. Elle est évidemment insuffisante, car les modalités de l'action n'en deviennent pas plus claires. Le problème se pose immédiatement de savoir si l'attaque est désordonnée en quelque sorte, c'est-à-dire produite au gré du hasard par des agents quelconques, ou bien si elle est réglée par des affinités moléculaires, ou par des aptitudes spéciales à attaquer certains

groupements moléculaires, ce qui aurait pour résultat une spécialisation des fonctions, comme nous l'a plusieurs fois révélé la *méthode élective*. Ne pourrait-on pas réussir, au moyen de cette méthode, à différencier les aptitudes des agents actifs sur tout le front, pour ainsi dire, des attaques microbiennes?

Elle a fait ses preuves dans tous les cas où il s'agissait d'un caractère physiologique bien spécial, qui distingue l'agent cherché du type banal. Il est facile alors d'imaginer un milieu répondant à cet écart. On connaît les exemples de ces *fonctions rares*; nitrification, nitratisation, oxydation du soufre, fixation de l'azote, quelques-unes encore de moindre importance. Celles-ci étudiées, la méthode paraissait avoir donné tout ce qu'elle pouvait. Certes, il n'est pas à nier que ces fonctions rares soient des cas de choix pour la méthode, mais il n'est pas prouvé, ni même probable, que le groupe si nombreux des espèces zymogènes soit si uniforme d'un bout à l'autre dans sa physiologie pour que l'on ne puisse lui appliquer un procédé basé sur la sélection physiologique. L'application serait plus difficile, mais, en y mettant le temps, on pourrait arriver à isoler encore quelques agents spécialisés.

Seulement le temps qu'il faudrait mettre pour ces opérations de microbiologie générale serait décidément trop long, et ce qui est encore plus grave, c'est que les cultures pures, jugées indispensables, ne nous apporteraient pas la compréhension des phénomènes qui se déroulent dans le sol. C'est une illusion, comme nous avons insisté déjà plusieurs fois, que de vouloir déterminer la répartition des rôles microbiens dans la nature au moyen de la culture pure. Libre de toute concurrence, une espèce pourra s'y montrer capable d'agir sur un grand nombre de substances qu'elle ne parviendra jamais à attaquer dans les conditions naturelles, car là elle pourra se heurter à une autre dont l'action est beaucoup plus intense et rapide. En présence d'une collectivité microbienne, où toutes les aptitudes sont très probablement représentées, ce ne sont donc que les *aptitudes spéciales*, la fonction de prédilection qui compte, et ce n'est que cette fonction qui doit être envisagée comme la *fonction naturelle de l'espèce dans le milieu sol*. Il est clair, par conséquent, que pour qu'elle puisse se mani-

fester, la libre concurrence pour la substance énergétique est la seule déterminante, ce qui conduit, non seulement à bannir la culture pure, mais à *se tenir strictement à la condition de n'opérer qu'en présence de la microflore entière d'un sol donné, sans aucune exclusion.*

Telles sont les idées qui ont conduit à établir un procédé nouveau qui est en quelque sorte à rebours des principes courants, à savoir : *au lieu de faire pulluler une espèce isolée sur un milieu à formule complexe, offrir une substance énergétique isolée à un mélange de microbes, tel que ce mélange existe dans le milieu sol.*

Quant au mode opératoire, il y aurait évidemment grand avantage à l'imaginer aussi simple et rapide que possible, ce qui permettrait à l'agrobiologie de sortir enfin du cadre de la microbiologie générale, avec ses méthodes trop laborieuses et trop lentes, et de multiplier les observations. Dirigé sur cette voie, on arriverait un jour à rendre l'analyse microbiologique du sol d'un emploi au moins aussi courant que l'est depuis si longtemps l'analyse chimique. Ce n'est qu'à ce prix que l'on pourra se former une idée complète du fonctionnement de la microflore du sol.

### La méthode.

La technique en est bien simple : on se sert d'un milieu solide imprégné d'une substance énergétique ; on l'ensemence avec des particules de terre. Nous avons déjà eu l'occasion d'appliquer ce mode opératoire à des cas particuliers. Cette fois il s'agit de lui donner la valeur d'une méthode générale. Discutons-la avec quelques détails.

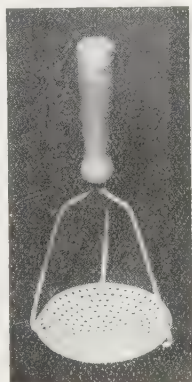
Il est évident que seul un gel minéral, le gel silicique, pourra servir utilement ; il est irremplaçable par la gélose, cette dernière n'étant pas un simple véhicule, mais un aliment elle-même.

Il n'y aurait rien à dire de la préparation de ce gel, qui est d'une simplicité élémentaire, si d'autres modes de préparation n'avaient été proposés que celui que nous avons adopté, moins pratiques et moins sûrs. C'est ce qui explique, peut-être, que son emploi tarde à se répandre. On lui reproche sa



préparation trop laborieuse, sa dessiccation rapide avec perte d'élasticité, son intolérance envers la stérilisation sous pression. De tout cela, seul le dernier reproche est vrai, mais justement, dans la grande majorité des expériences agrobiologiques, y compris surtout celles dont il s'agit dans ce mémoire, la stérilisation prolongée à des températures au-dessus de 100° est absolument inutile. Résumons donc encore une fois le mode opératoire auquel on se tient dans notre laboratoire depuis des années.

On mélange une solution de silicate de soude pure et incolore, étendu jusqu'à environ 9° B. avec de l'acide chlorhydrique étendu à 13° B. en parties égales, en versant le silicate dans l'acide. On distribue le mélange à raison de 30 cent. cubes par boîte Pétri de 10 centimètres de diamètre et de 200 cent. cubes par boîte de 20 centimètres. On attend pendant plus de vingt-quatre heures jusqu'à ce que le gel soit devenu bien *vibrant*, ce que l'on reconnaît en tenant la boîte dans la main et en la frappant à petits coups. Les boîtes sont mises alors à laver à l'eau courante dans une grande cuvette de 60 sur 80 centimètres, laquelle peut contenir plusieurs douzaines de petites plaques et une douzaine de grandes. On les y laisse au moins deux à trois jours, après quoi elles sont soumises à un lavage à l'eau distillée bouillante. Les dernières eaux de lavage ne doivent pas donner de trouble avec le nitrate d'argent. Ainsi lavées, les petites plaques sont empilées, couvercle en bas, dans des boîtes de verre de 25 centimètres de diamètre, profondes de 6 centimètres, où toute une douzaine trouve place; les grandes sont conservées en position retournée, en ayant soin de verser une mince couche d'eau sur le couvercle formant cuvette. Les unes et les autres se conservent de longs mois en parfait état, de sorte qu'on les a toujours sous la main, prêtes pour l'emploi. Au moment de s'en servir, il est bon de leur faire subir un bain d'eau bouillante de courte durée : pour cela on les place sur la plaque perforée du *pilon-tamiseur* figuré ci-contre (que l'on trouve en vente comme article de ménage) et on les immerge dans de l'eau en pleine ébullition, où on les tient pendant environ trente secondes. Les petites bulles qui apparaissent dans le gel disparaîtront dans la suite. Toutes ces opérations demandent, il est vrai, quelques jours, mais elles peuvent être confiées à un aide de laboratoire, pour ne pas absorber le temps du personnel scientifique.



1/5 de grandeur naturelle.

Le gel prêt est imprégné des sels minéraux ordinaires et de la substance énergétique choisie. Le choix en est, bien entendu, immense, mais le biologiste prendra naturellement celles qui ont le plus d'importance biologique : alcool, acides organiques, saccharides, polysaccharides, corps aminés, protides. La substance offerte sera toujours la seule substance organique du milieu. La condition est essentielle : ce serait notamment réduire la méthode à l'impuissance que de présenter une combinaison nutritive complexe, en suivant les formules de la

microbiologie générale, à savoir, une substance ternaire accompagnée de peptone, asparagine ou autre matière organique azotée. Les pullulations rapides et massives que ces corps quaternaires provoquent suffiraient pour masquer totalement l'effet de la substance ternaire à l'épreuve.

Par conséquent, la source d'azote dans le milieu, en cas de matière énergétique non azotée, ne pourra être que minérale : sel ammoniacal ou nitrate, la quelle est, du reste, le plus souvent disponible au sein du sol.

Eu égard aux fixateurs d'azote, il y aura parallèlement, pour chacune des substances éprouvées, un lot entièrement dépourvu d'azote combiné.

S'agira-t-il de faire pulluler les nitrificateurs, on remplacera la matière organique par une dose de sel ammoniacal ou nitreux.

L'ensemencement des plaques se faisant par de petites doses de terre, la préparation d'un échantillon représentatif demande des soins que nous pouvons, du reste, nous dispenser de décrire en détail. Remarquons seulement que l'on se gardera de trop sécher l'échantillon pour lui conserver la structure granuleuse normale de la terre. L'état favorable est facilement trouvé en le manipulant avec les doigts, au besoin désinfectés. On ameublit soigneusement les grumeaux avant de passer la masse à travers une passoire en aluminium percée de trous de 1 millimètre, que l'on peut flamber avant l'usage. On prépare ainsi des échantillons de 500 grammes environ, que l'on conserve pendant les expériences dans des flacons bien bouchés après dosage de l'humidité.

La dose de terre ne doit pas être quelconque, mais pesée jusqu'à la deuxième décimale et calculée en poids sec. Elle doit toujours être faible pour être négligeable au point de vue de l'apport de quelque aliment supplémentaire. Il suffit de prendre un décigramme, au maximum deux, pour une plaque de 10 centimètres dont on se sert ordinairement.

Dans le cas où il s'agit d'une terre très active, dont on veut déterminer la dose très exactement, on le fait commodément en se servant d'un petit creuset Gooch, muni de sa soucoupe et d'un couvercle; on y jette un peu de terre, on pèse le petit appareil jusqu'à la troisième décimale, puis en prenant le

creuset dans la main et en lui imprimant de légères secousses, on fait tomber sur la surface de la plaque autant de particules de terre que l'on juge nécessaire pour l'ensemencement. En repasant alors le système, la perte de poids correspondra à la dose semée.

Parfois il y a avantage à ranger les grains sur la surface du gel en les espaçant, ce qui facilite la différenciation des végétations qui paraissent en entourant les grains de zones à caractères différents. La dose est d'un centigramme environ si l'on dispose une centaine de grains sur la plaque. Ce nombre convient fort bien s'il s'agit de fixation ; il peut être réduit encore, lorsque le gel est chargé de glucides avec azote ou de protides. On doit, par contre, tripler ce nombre, si l'on vise les nitrificateurs, car autrement on risquerait de ne constater que leur absence dans le cas, assez fréquent, d'un échantillon de densité très faible.

Supposons maintenant les plaques prêtes, ensemencées avec de la terre, mises à l'étuve à 30°. Quels sont les effets à suivre ? Ils peuvent être définis avec précision comme suit :

*Ce sont les pullulations les plus précoces qui sont en même temps les pullulations dominantes qu'il s'agit de saisir.*

La pullulation dominante tient dans la méthode la place de la culture pure traditionnelle, et il est clair que cette prédominance est l'expression même d'une aptitude spéciale à attaquer la substance offerte en refoulant tous les compétiteurs.

Il importe d'ajouter que seule la première phase de la culture collective intéresse l'opérateur. Cette phase passée, le milieu doit avoir subi déjà des modifications assez profondes pour ne plus permettre de rapporter les réactions microbiologiques observées à la substance originelle. Les pullulations secondaires qui commencent à s'infiltrer dans la pullulation dominante sont le signe que le moment est venu de terminer l'expérience.

Le plus souvent il n'est plus utile de la prolonger au delà de deux jours ; parfois il suffit de vingt-quatre heures et même d'une dizaine d'heures. S'il s'agit d'une substance difficilement attaquable, la cellulose, par exemple, on attend, bien entendu, autant qu'il faut pour que les pullulations dominantes se précipitent.

Ajoutons que, pour créer des conditions anaérobies, moins

importantes car plutôt exceptionnelles dans le sol, il n'y a qu'à placer les plaques dans un récipient dont l'atmosphère est privée d'oxygène. On ne s'en occupera pas dans le présent mémoire.

Il résulte de tout ce que l'on vient de dire que les plaques doivent être surveillées de près dès le début même des pullulations. On les soumet : 1° à un examen morphologique ; 2° à des épreuves chimiques.

Pour le premier, on commence par comparer soigneusement à l'œil nu et à la loupe les végétations parues et on tâche de les différencier, ce qui ne présente aucune difficulté : hyalines, laiteuses ou opaques, incolores, blanches, jaunâtres, brunâtres ou autrement colorées, bombées ou plates, grandes ou petites, rondes, à bord frangé ou muni d'excroissances, etc., on trouve toujours des caractères qui permettent de juger si les colonies appartiennent à une seule forme ou à plusieurs. Quelques préparations, au maximum une demi-douzaine, suffisent dans chaque cas pour en décider. La tâche est grandement facilitée par l'homogénéité toujours très satisfaisante des pullulations. Il n'est pas rare même de leur trouver l'aspect d'une culture pure, comme on pourra s'en assurer par l'examen des photographes pris sur nos préparations par M. Jeantet, microphotographe de l'Institut Pasteur.

L'étude microscopique ayant déterminé les formes, les épreuves chimiques renseigneront sur leur activité. On établit l'action la plus marquée d'un microbe donné, et cela, non seulement en dosant le produit final, mais encore en suivant la marche même du processus provoqué. Ceci est indispensable particulièrement dans les expériences comparées sur divers échantillons, car dans ce cas le taux du produit final ne dit pas grand'chose sur l'intensité des processus, les échantillons d'activité différente arrivant à la même quantité du produit, si on leur en donne le temps. Il est donc nécessaire de contrôler leur marche à un moment, quand les cultures sont encore bien en train, disons avant que la matière énergétique soit épuisée ou presque.

Voici les épreuves, tant chimiques que microbiologiques, que nous proposons et qui paraissent suffire pour établir la fonction.



1. Dans le cas de protides et de corps aminés, c'est évidemment le dégagement de l'ammoniaque qui importe. Un petit carré de papier tournesol rouge fixé à la face intérieure du couvercle de la boîte Pétri indiquera le moment de son apparition. Pour son dosage, on jette toute la couche du gel dans un ballon et on distille dans de l'acide N/10.

2. Dans le cas des acides organiques, c'est le degré de l'alcalinité qui donnera la mesure de l'action, en se servant de sels de soude qui sont, du reste, d'un emploi très commode à cause de leur solubilité. Pour un dosage, on sèche le gel, on le réduit en poudre que l'on épuise avec de l'eau chaude, on titre la solution avec de l'acide N/10. Qualitativement, on peut suivre la marche du processus en déterminant la réaction du gel sans sacrifier, ni déranger les cultures, au moyen de la méthode rapide que nous allons décrire brièvement.

On se sert de solutions des quatre colorants de Clark et Lubs : bromo-thymol bleu, rouge de phénol, rouge de crésol, bleu de thymol. Pour les épreuves, on laisse tomber deux gouttes des colorants dans les godets d'une plaque de porcelaine pour essais comparatifs. Pour produire un virage plus accentué, on pousse préalablement les teintes vers le côté acide, en plongeant *le bout* d'un fil de platine dans une faible solution de phosphate monopotassique et en le lavant ensuite dans les petites portions de colorants. On obtient ainsi, en répétant au besoin l'artifice, une teinte plus claire et à peu près toujours la même, soit : vert bouteille pour le bromo-thymol bleu, jaune orange pour le rouge de phénol, jaune brunâtre pour le rouge de crésol, jaune or pour le bleu de thymol. Pour faire les épreuves, il n'y a qu'à prélever au moyen d'une spatule de platine, large de 2 à 3 millimètres, une particule du gel grosse comme un grain de blé et à la mettre dans le godet au milieu de la goutte colorée. Le *pH* étant réglé à 6,8 jusqu'à 7,2, le grumeau prend une teinte vert émeraude à bleu verdâtre dans le bromo-thymol bleu, sans la moindre action sur les trois autres indicateurs. S'il y a, par contre, concentration des ions OH, les colorants en indiqueront les progrès : le petit grumeau s'y entourera momentanément d'un halo vivement coloré en faisant ensuite virer la goutte entière. On pourra alors distinguer une gamme de cinq degrés :

Virage au bleu indigo dans le bromo-thymol bleu : *pH* 7,3-7,6.

Virage au rouge vif dans le rouge de phénol : *pH* 7,6 à 8,2.

Virage au violet intense dans le rouge de crésol : *pH* 8,2 à 8,6.

Virage au bleu d'acier dans le bleu de thymol : *pH* 8,6 à 9.

Virage au bleu indigo dans le bleu de thymol : *pH* au-dessus de 9.

La rapidité des épreuves ne laisse rien à désirer; il suffit de quelques minutes pour les exécuter avec un résultat suffisamment exact pour notre but.

On pourrait également suivre l'acidification d'un milieu à glucides avec azote au moyen d'une méthode simplifiée du même genre, mais moins commodément.



3. Pour le dosage des produits volatils, acides et alcools, on jette le gel dans un ballon, on le malaxe avec de l'eau et on recueille les produits par distillation d'après les méthodes chimiques connues.

4. Pour estimer l'action sur la cellulose, on se sert de feuilles de papier à filtrer ou de chiffons de cotonnade (libre d'apprêt). Le nombre et les caractères des taches colorées qui y paraissent donnent une idée assez représentative des agents de cette dégradation dans une terre donnée. Pour doser la quantité détruite au bout d'un temps déterminé, il est bon d'arrêter l'expérience à un moment, quand la trame conserve encore quelque résistance. On enlève alors du gel assez facilement les restes du papier ou du tissu, on les fait bouillir quelques minutes dans de la soude à 1 p. 100 pour les débarrasser de l'oxycellulose et du mucus, on lave jusqu'à disparition de la réaction alcaline, on sèche jusqu'à poids constant.

5. Pour établir la fixation de l'azote gazeux, un dosage Kjeldahl n'est plus nécessaire en l'état actuel de nos connaissances. Il suffit d'une abondante pullulation des formes *Azotobacter*, si facilement reconnaissables à première vue, sur un milieu privé d'azote combiné, pour être sûr qu'une fixation a lieu aux dépens de la substance énergétique offerte. La détermination comparée du pouvoir fixateur des échantillons de terre se fait également le mieux au moyen de la méthode microbiologique, en déterminant la densité des germes spécifiques dans les échantillons.

6. La nitritation est des plus faciles à suivre dès ses tout premiers débuts jusqu'à la fin. On le fait en prélevant des particules de gel et en les jetant dans quelques gouttes de liqueur de Trommsdorf où l'on constate un léger nuage azur, au début, puis une tache d'un bleu de plus en plus foncé jusqu'à la teinte indigo noirâtre. La gradation est assez démonstrative pour permettre de juger de la marche du processus. On continue avec le réactif de Nessler jusqu'à ce que les grumeaux ne prennent plus la moindre teinte jaune, indice suffisamment exact de l'oxydation achevée de l'azote ammoniacal. Ces épreuves suffisent assez souvent pour comparer l'activité nitritatrice des échantillons. Pourtant, la méthode que nous avons récemment

indiquée dans une note à l'Académie des Sciences (1) paraît plus instructive sur bien des points.

7. La nitratisation se laisse moins bien suivre. La réaction de Trommsdorf qui est au maximum à l'épreuve de milieux nitrités ne disparaît pas graduellement, mais presque d'un coup avec les dernières traces de nitrite. Elle n'indique donc que le point final. Après sa disparition la réaction de la diphénylamine sulfurique indique la présence des nitrates.

La méthode ainsi fixée dans tous les détails, il s'agissait de l'appliquer à des échantillons choisis de manière à présenter le plus de différences au point de vue microbiologique. Il est évident que son application sous la forme d'une étude comparée est la plus instructive. Du moment que l'on ne possède que des notions assez vagues et incomplètes sur la population microbienne du milieu naturel, que l'on n'a pu établir encore aucun étalon, c'est même le seul moyen de s'en servir pour avoir une idée de son efficacité.

Nous avions à notre disposition deux parcelles du même champ d'expérience, dont l'une a été régulièrement cultivée et fumée pendant près d'une dizaine d'années; aux dépens de la fumure et des restes végétaux, les pullulations microbiennes y avaient libre cours; nous l'appellerons *Esp.* (abréviation de *Espalier*). L'autre désignée *Tém.* (abréviation de *Témoin*) avait été, par contre, privée de tout engrais et de toute végétation pendant la même période de temps; tenue propre et ameublie de temps en temps, la parcelle restait en jachère noire; depuis quelques années, elle est devenue bien pauvre en azote et en acide phosphorique, ainsi qu'en matière noire, ce que l'on voyait déjà d'après sa teinte nettement plus claire que ses voisines normalement cultivées. C'est dire que sa microflore avait dû subir une inanition certaine, dont les effets ne pouvaient rester sans influence sur sa densité et son activité.

L'emploi simultané de ces deux terres presque dans toutes les expériences permettait de s'approcher de deux questions, à savoir : 1° retrouvera-t-on les mêmes formes douées des mêmes fonctions dans les deux échantillons; 2° y aura-t-il des

(1) Nouvelles recherches sur les microbes de la nitrification. *C. R. Ac. Sc.*, 192, séance du 27 avril 1931.

différences dans la composition de la population microbienne provoquées par le traitement défertilisant. Si les deux terres sont d'accord, ne devra-t-on pas conclure que la prédominance de telle ou telle forme dans des conditions déterminées ne peut pas être attribuée à quelque hasard, mais doit être considérée comme l'expression même de l'activité naturelle des espèces. Quant à la réponse à la deuxième question, elle fera peut-être entrevoir si la population active subit des changements sous l'influence du traitement et dans quel sens.

Avant de décrire la série des expériences d'après cette méthode, il importe d'insister sur ce que ni leur programme, ni leurs résultats immédiats, ni les conclusions auxquelles elles donnent lieu, n'ont rien de définitivement arrêté. Elles ne doivent être envisagées que comme une première tentative d'application d'une méthode nouvelle. Il est évident que des expériences extrêmement nombreuses seront nécessaires avant d'arrêter le plan des opérations le plus avantageux pour l'analyse microbiologique du sol, qui serait d'une application générale. Il nous semble toutefois que ce travail qui est à l'ordre du jour devra s'inspirer des principes exposés dans ce mémoire.

#### LES EXPÉRIENCES.

On s'est servi de préférence de plaques de 10 centimètres de diamètre. La solution de sels minéraux était toujours la même, à savoir :

Phosphate monopotassique . . . . .	1,0	gramme
Sulfate de magnésie . . . . .	0,5	—
Chlorure de sodium . . . . .	0,5	—
Sulfate ferreux . . . . .	0,02	—
Sulfate de manganèse . . . . .	0,02	—
Eau distillée . . . . .	200	cent. cubes

On en prend 2 cent. cubes par plaque, on ajoute 2 à 3 centigrammes de carbonate de chaux, puis la dose de substance organique; on ajuste le *pH* avec une solution de potasse à 2 p. 100 (éventuellement avec de l'acide sulfurique N/10) à 6,8-7,2. En délayant avec un peu d'eau distillée, on fait bouillir dans une petite fiole (modèle Fourneau), on jette le liquide bouillant sur la plaque, on rince avec un peu d'eau bouillante. La plaque est alors mise à évaporer à environ 55° jusqu'à la

disparition de la nappe liquide. On l'ensemence avec de la terre, comme déjà décrit.

Toutes les plaques sont tenues à l'étuve à 30°.

I. PLAQUES PEPTONÉES. — Dose 0 gr. 2 par plaque. Ensemencement *Esp.* et *Tém.*, 0 gr. 2 de terre par plaque. Séjour à l'étuve vingt-quatre heures ; se montre trop long : les surfaces sont entièrement envahies, aucune différence d'intensité entre *Esp.* et *Tém.*

*Deuxième expérience.* Identique à la première, mais séjour à l'étuve seize heures. Les plaques *Esp.* sont presque entièrement recouvertes de colonies bactériennes, sur *Tém.* on trouve encore des parties libres. Un carré de papier tournesol fixé à l'intérieur des boîtes *Esp.* et *Tém.*, après ventilation, bleuit beaucoup plus rapidement dans la première. Un dosage d'azote ammoniacal parallèlement dans les deux donne, en milligrammes :

*Esp.* : 14,8.

*Tém.* : 8,4.

*Troisième expérience.* Identique aux deux précédentes, mais durée d'étuve dix heures. Les carrés de tournesol commencent à bleuir au bout de sept à huit heures, plus tôt dans *Esp.* que dans *Tém.* Les colonies entourant les particules de terre sont plus nombreuses dans la première. Dosage de l'azote ammoniacal, en milligrammes :

*Esp.* : 4,56.

*Tém.* : 3,60.

L'étude microscopique des colonies parues sur toutes les plaques fait constater qu'elles appartiennent à *une seule forme* de bacille filamenteux sporogène. On a le tableau d'une culture pure comme le montre la figure 1, pl. I. Les deux échantillons sont parfaitement d'accord sur ce point.

Notons en passant ce premier fait qui apporte des précisions dont la méthode courante, basée sur le principe de la culture pure, est totalement incapable. En effet, la peptone est considérée comme aliment de prédilection quasi universel pour les hétérotrophes ; il paraît donc logique de croire que toute la microflore, presque sans distinction, s'attaque à elle et pullule

dans le sol à ses dépens. Or, ce ne sont que les bacilles filamenteux qui s'en emparent en pullulant avec une rapidité défiant toute concurrence. Potentiellement immanente à l'énorme majorité des espèces microbiennes, la fonction de dégrader ce protide apparaît donc dévolue dans la nature à une ou, peut-être, à un petit nombre d'espèces bacillaires typiques

PLAQUES A L'ASPARAGINE. — Dose 0,25 par plaque. Au bout de douze heures, *Esp.* dégage une odeur ammoniacale; le papier tournesol bleuit rapidement dans l'air confiné de la boîte: des carrés de papier coloré avec de la fuchsine S. (acide) se décolorent en quelques minutes. Dans *Tém.*, on ne perçoit pas d'odeur ammoniacale; les papiers indicateurs virent beaucoup plus lentement. Dosage de l'azote ammoniacal au bout de vingt-quatre heures, en milligrammes :

*Esp.* : 28,0.

*Tém.* : 22,0.

L'examen microscopique montre un tableau homogène d'un bacille filamenteux à filaments très épais, nettement différent de celui de la peptone. (Voir fig. 2, pl. I). Les deux échantillons sont parfaitement d'accord sur ce point.

PLAQUES A L'URÉE. — Dose 0 gr. 3 semée directement sur le gel, où elle se dissout et s'imprègne au bout d'un quart d'heure. Ce n'est qu'alors que la solution de sels est jetée à l'état bouillant sur les plaques. Après quatre jours seulement un petit carré de papier tournesol rouge vire au bleu dans l'air confiné de la boîte *Esp.* au bout de vingt minutes. Dans *Tém.* le virage demande un temps plus que double. Dosage d'azote ammoniacal au bout de cinq jours, en milligrammes :

*Esp.* : 4,4.

*Tém.* : 3,0.

Dans la suite le processus s'accroît : au bout d'une quinzaine *Esp.* dégage une odeur nette d'ammoniaque, que l'on perçoit à peine dans *Tém.* Le tournesol vire instantanément dans *Esp.*, dans *Tém.* au bout d'une heure encore rien. L'examen



microscopique ne montre que des traces de mucus hyalin entourant les particules de terre, trop faible pour réussir du premier coup à établir le diagnostic de la pullulation dominante. On n'y est plus revenu.

On voit que la décomposition de l'urée pure est très lente; elle marche tout de même, et elle est plus active sous l'effet d'un sol plus actif. La décomposition de l'urine est, par contre, extrêmement rapide, comparable à celle de la peptone.

PLAQUES A L'URINE. — Deux lots *Esp.* et *Tém.* en reçoivent 10 cent. cubes par plaque sans autre addition. Le papier tournesol vire dans l'air confiné des deux boîtes au bout de quatre heures. Dosage de l'azote ammoniacal au bout de douze heures, en milligrammes :

*Esp.* : 44,6.

*Tém.* : 9,6.

Les agents sont de nature bactérienne; on a omis par mégarde d'établir plus exactement leur morphologie. La lacune ne sera pas difficile à combler.

Passant aux *glucides*, nos études antérieures (1) donnent une orientation provisoire suffisante sur les pullulations qu'ils provoquent. On sait que la qualité de ces pullulations dépend essentiellement de la dose d'azote combiné disponible. Quand elle est à zéro, ce sont les *Azotobacter* qui envahissent le milieu glucosé ou mannité. Une dose minime d'azote fera apparaître des bacilles suivis par des *Azotobacter*, qui les refouleront. A mesure que monte la dose, les bacilles deviennent de plus en plus maîtres du milieu, jusqu'à composer la pullulation dominante, tandis que les *Azotobacter* se raréfient et finissent par disparaître. La dose d'azote déterminera également la prédominance de telle ou autre forme bacillaire. Ainsi, quand il n'y a que des traces, ce sont les *bacilles gommeux* qui pullulent, présentant l'aspect caractéristique de colonies bombées, hyalines, formées d'une gelée résistante, où logent d'assez rares bâtonnets écartés par la substance gommeuse qu'ils

(1) Voir *Etudes sur la microbiologie du sol*, 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> mémoires. Ces *Annales*, 40 et 42, 1926 et 1928.

sécrètent. Quand la dose atteint 0,5 à 1 p. 100 de mannite, ce sont les formes bacillaires non filamenteuses, désignées sous le nom *Clostridium* et *Plectridium*, qui font leur apparition et qui envahissent le milieu en amenant une rapide acidification.

PLAQUES A LA CELLULOSE. — On imprègne deux grandes plaques avec la solution saline additionnée de nitrate et de carbonate de chaux, soit par plaque :

Solution saline. . . . .	10 cent. cubes
Nitrate de potasse. . . . .	0 gr. 3
Carbonate de chaux. . . . .	0 gr. 1
Solution de potasse à 2 p. 100 . . . . .	XV gouttes
	ou q. s. pour pH 7,0

On ajoute 20 cent. cubes d'eau distillée, on fait bouillir, on jette sur le gel. Après évaporation de la nappe liquide, on étend sur la surface sans interstices 40 carrés de tissu de coton de 4 centimètres de côté, en couvrant toute la surface; préalablement, on les sèche, on pèse, puis on stérilise par ébullition dans de l'eau. Leur poids sec est dans *Esp.* 2 gr. 28, dans *Tém.* 2 gr. 47.

Les taches commencent à paraître vers le troisième jour. Au bout de quatre jours, la différence est frappante : on trouve sur *Esp.* 20 à 50 taches par carré de chiffon, sur *Tém.* de 5 à 20. Sur *Esp.*, elles se sont déjà étendues en couvrant chacune 0,5 à 1 cent. carré; sur *Tém.*, elles ne dépassent pas 1 à 3 millimètres. Toutes sont des colonies bactériennes. Les taches jaunes, d'aspect sec, de nuances diverses sont produites par des *Cellvibrions* (voir fig. 3, pl. I); les taches jaune d'œuf et oranges d'un aspect gras par des *Cytophaga* (voir fig. 5 et 6); enfin, les taches vertes et grises, ou muqueuses, incolores, par les fuseaux verts et les faucilles (voir fig. 4, pl. I). Tardivement, soit au bout de cinq à six jours, apparaissent les taches noires et vert olive produites par les champignons. Il y en a quelques dizaines sur *Esp.*, moitié moins sur *Tém.* Dans la suite, les plaques se couvrent de plus en plus d'un duvet mycélien.

Au bout de dix jours, on dose les fibres non décomposées. Enlevés au moyen d'une pincette, les restes des chiffons sont

jetés dans un grand verre contenant une solution de soude à 1 p. 100. L'opération marche bien avec *Tém.*, elle n'est pas si aisée avec *Esp.* où la trame du tissu se désagrége au toucher. A l'ébullition dans la soude, la solution prend une teinte brun foncé avec les restes des chiffons d'*Esp.*, elle est d'un jaune d'or avec ceux de *Tém.* Débarrassés par ce traitement des produits de la décomposition, ainsi que des particules de terre, les débris, repris avec une pincette, sont lavés dans de grandes quantités d'eau jusqu'à disparition de la réaction alcaline des eaux de lavage, séchés et pesés. On a en grammes :

<i>Esp.</i> poids initial. . . . .	2,28
poids restant . . . . .	4,08 soit perte 47,4 p. cent
<i>Tém.</i> poids initial. . . . .	2,47
poids restant . . . . .	4,82 soit perte 26,5 p. cent

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Pour mieux déterminer la densité des germes spécifiques, surtout par catégories, il est plus avantageux d'employer un rond de papier à filtrer et d'ensemencer non pas avec de la terre en nature, mais avec une délayure. On en prépare une de *Esp.* et de *Tém.* et on en prend pour l'ensemencement de deux grandes plaques des doses équivalentes à 5 centigrammes de terre.

Au bout de trois jours on compte sur :

*Esp.* : 35 taches jaunes 1 à 2 cent. de diam. envahissantes (*Cellvibrio*).

*Tém.* : 1 seule tache jaune 0 cent. 5 de diam. et 14 petites taches vertes (fuseaux).

Les nombres continuent à s'accroître de quelques dizaines par jour sur *Esp.*, de quelques unités sur *Tém.* Ces nouvelles taches sont en majorité fibrolytiques, jaunes et oranges (*Cytophaga* isolé ou en mélange avec des vibrions et des coccus). Il est trop difficile pourtant de les distinguer des taches vibriennes et de les dénombrer à part. On se contente donc de dénombrer en bloc les colonies bactériennes d'un côté, les taches mycéliennes, d'un autre. Celles-ci apparaissent, comme d'ordinaire, tardivement, quand les bactéries paraissent avoir déjà terminé leur développement, et s'étendent encore longtemps en couvrant les plaques de leurs touffes.

## Résultat final des numérations :

<i>Esp.</i> :	colonies bactériennes	88	pour 5 centigr.	soit	1760	par gr.
	colonies mycéliennes	14	pour 5 centigr.	soit	280	par gr.
<i>Tém.</i> :	colonies bactériennes	33	pour 5 centigr.	soit	660	par gr.
	colonies mycéliennes	2	pour 5 centigr.	soit	40	par gr.

Une troisième expérience avec deux lots de petites plaques *Esp.* et *Tém.*, couvertes de ronds de papier et ensemencées avec l'équivalent de 1 centigramme de terre en délayure, a donné des nombres sensiblement pareils. La différence entre les deux terres était toujours frappante. Les nombres totaux n'ont pas dépassé ceux qui viennent d'être mentionnés. Ces nombres sont certainement bien au-dessous de la réalité, à cause du caractère de ces végétations qui se suivent en envahissant la surface, ce qui empêche les colonies tard venues de se développer et les masque. Il n'en est pas moins vrai que les germes spécifiques au sein d'un sol, où il n'y a pas de fibres cellulosiques en voie de décomposition, sont peu nombreux, ce qui pourrait s'expliquer par leur manque de résistance; en effet, non seulement ils ne produisent pas de spores, mais ils s'autolysent en masse avec une facilité surprenante, aussitôt que les pullulations se ralentissent, faute de fibres fraîches.

Abandonnons maintenant les molécules complexes, pour commencer à l'autre bout, en quelque sorte, en exposant aux épreuves les molécules les plus simples : celles des alcools et des acides de la série grasse à un et jusqu'à quatre atomes de carbone : formiate, acétate, propionate, butyrate, alcool méthylique, éthylique, butylique normal. Le rôle de ces déchets organiques a été à peine effleuré par la microbiologie générale, et cependant, si l'on songe que toutes les fermentations — celles des sucres, de l'amidon, des substances pectiques, de la cellulose, etc. — y aboutissent, leur utilisation est une question de première importance au point de vue de l'énergétique du sol.

Il y aura deux séries de plaques : l'une pourvue d'une dose appropriée d'azote combiné, l'autre sans azote. Dans la première, il y aura toujours deux lots, *Esp.* et *Tém.*, dans la

seconde, un seul lot *Esp.* suffira, car il ne s'agira que de la réaction des fixateurs aérobies, en général, envers la substance éprouvée. Pour comparer le *pouvoir fixateur* des échantillons, soit les densités des *Azotobacter*, des expériences spéciales seront décrites.

#### SÉRIE AVEC AZOTE COMBINÉ.

PLAQUES AU FORMIATE DE SOUDE. — Dose de formiate 0 gr. 3. Dose d'azote ammoniacal et nitrique sous forme d'une solution titrée de nitrate d'ammoniaque : 5 milligr. 2. Au bout de quarante-huit heures, épreuves du *pH* du gel (voir méthode simplifiée p. 101) : *Esp.* environ 9,0, *Tém.* sans changement. Examen des pullulations : mucus en voile irisé, composé d'un coccus à l'état presque pur (voir fig. 7, pl. I). Mélange insignifiant de quelques formes en bâtonnets. Au bout de cinq jours, la différence est plus accentuée : *Esp.* *pH* au-dessus de 9,0 (bleuissement maximum du bleu de thymol), *Tém.* environ 7,6 (rouge de phénol, trace de virage). Dosage de l'alcalinité par titration avec acide N/10 :

*Esp.* : l'extrait du gel prend 8 cent. cubes.

*Tém.* : virage à la première goutte.

Dans *Esp.*, il n'y a donc qu'une petite partie de formiate décomposée au bout de plusieurs jours, dans *Tém.* presque rien. Le processus peut donc marcher lentement sous l'action d'une microflore active, mais ne bouge qu'à peine sous l'influence d'une microflore affaiblie.

PLAQUES A L'ACÉTATE DE SOUDE. — Dose 0 gr. 3. Azote sous forme de nitrate de calcium : 3 milligr. 5. Au bout de quarante-huit heures sur :

*Esp.* : mucus bactérien peu abondant.

*Tém.* : pas de mucus bactérien, quelques petites touffes de mycélium.

#### Dosage de l'alcalinité :

*Esp.* : équivalente à 15 cent. cubes 5 acide N/10.

*Tém.* : équivalente à 9 cent. cubes acide N/10.



Dans une seconde expérience, on donne plus d'azote, soit 10 milligr. 4 sous forme de nitrate de calcium. Même dose d'acétate. La végétation est plus marquée. Au bout de quarante-huit heures, colonies bactériennes sur *Esp.* et *Tém.* D'un aspect sec, le mucus bactérien est plus abondant sur la première. Sur *Tém.*, il est, par contre, d'un aspect gras et brillant; la différence est assez marquée pour laisser prévoir des pullulations différentes. En effet, sur *Esp.* la pullulation est celle d'un *Spirochète* avec un faible mélange d'articles bacillaires en chapelets courts (voir fig. 8, pl. I). Sur *Tém.* le *Spirochète* est introuvable, la pullulation est due à un bacille à articles en chapelets produisant de grosses spores, identique à celui qui a paru sur *Esp.* (voir fig. 9, pl. II.)

PLAQUES AU BUTYRATE DE SOUDE. — Dose 0 gr. 2. Azote 10 milligr. 4 sous forme de nitrate d'ammoniaque. On règle le pH de la solution trop alcaline au moyen de l'acide N/10 à 7,0.

Au bout de quarante-huit heures, on éprouve la réaction. Dans *Esp.*, elle est déjà à  $pH = 9,0$ ; dans *Tém.* à peine 7,8. Au bout de trois jours, les végétations bactériennes sont assez notables. Il y a sur *Esp.* : 1° un voile sec s'étendant largement; 2° quelques gouttelettes hyalines. Le premier est composé de Spirochètes pareils à ceux de l'acétate, les secondes appartiennent à un coccus (voir le tableau microscopique fig. 10, pl. II). Sur *Tém.*, on ne trouve que le mucus hyalin appartenant à un coccus avec un mélange insignifiant de quelques formes en bâtonnets, d'un aspect dégénéré, incolores, remplies de gouttes d'huile (voir fig. 11).

Au bout de cinq jours, on dose l'alcalinité :

Sur *Esp.* elle équivaut à 7,0 acide N/10.

Sur *Tém.* elle équivaut à 3,0 acide N/10.

Il reste encore de l'acide volatil dans les deux. Le dosage donne :

Sur *Esp.* l'équivalent de 2,3 de baryte N/35.

Sur *Tém.* l'équivalent de 8,3 de baryte N/35.

Le processus n'est donc pas actif, mais il l'est nettement plus avec une terre plus active.

En laissant sans mention une expérience avec le *propionate de soude* qui n'a pas donné de résultats engageants à la répartition, passons à l'acide lactique et à quelques acides bi et tri-basiques biologiquement intéressants.

PLAQUES AU LACTATE DE SOUDE. — Dose environ 0 gr. 3. Azote ammoniacal et nitrique 10 milligr. 4;  $pH = 6,9$ .

Au bout de vingt-quatre heures, les colonies sont imposantes : les particules de terre sont entourées de mucus crémeux presque pareil partout. Au bout de quarante-deux heures, la réaction de *Esp.* est plus alcaline que celle de *Tém.*, mais la différence n'est pas considérable : 9,0 contre 8,5. On ne trouve de différences morphologiques entre la forme dominante sur les deux : la prédominance décisive appartient à un court bâtonnet à bouts arrondis, une coccobactérie. Ses masses uniformes sur les deux lots sont piquées par des articles isolés d'un gros bacille (voir fig. 13, pl. II).

PLAQUES AU SUCCINATE DE SOUDE. — Dose : 0 gr. 3. Azote : 10 milligr. 4.  $pH = 7,0$ . Au bout de dix-huit heures, la plaque *Esp.* présente de très nombreuses colonies, plates, adhérentes, d'aspect gras, légèrement brunâtres. *Tém.* encore rien.

Au bout de quarante-huit heures, la plaque *Esp.* est entièrement recouverte jusqu'au bord par cette végétation caractéristique que l'on voit seulement débiter sur *Tém.* Elle est composée d'une coccobactérie remarquablement pure partout (voir fig. 16, pl. II).

PLAQUES AU TARTRATE DE SOUDE. — Dose : 0 gr. 3. Même dose d'azote. Même  $pH$ . Déjà, au bout de vingt-quatre heures, colonies notables sur *Esp.*, faibles sur *Tém.* Au bout de quarante-huit heures, les deux sont couvertes d'un grand nombre de colonies à mucus crémeux. L'examen microscopique montre la pullulation d'une coccobactérie pareille, ou presque pareille, aux précédentes. Le tableau est entièrement homogène ; aspect de culture pure (voir fig. 14, pl. II).

PLAQUE AU CITRATE DE SOUDE. — Dose : 0 gr. 3. Le reste comme précédemment. Au bout de vingt-quatre heures, sur *Esp.*,

colonies d'un mucus laiteux, entourant de zones massives les grains de terre, munies d'excroissance à leur périphérie libre. Sur *Tém.* on ne voit encore rien.

Au bout de quarante-huit heures, le *pH* sur *Esp.* dépasse 9,0, sur *Tém.*, il est un peu au-dessus de 8,0. Colonies bactériennes notables sur les deux. On distingue : 1° mucus hyalin jaunâtre formant excroissances dendritiques; 2° petites zones rondes, blanches, opaques, entourant les particules de terre. Le mucus jaunâtre domine sur les deux; il est composé d'un coccus ou coccobactérie; homogénéité complète, aspect d'une culture pure (voir fig. 15, pl. II). Les secondes sont dues à de curieux pelotons de filaments de nature inconnue. La différenciation et l'identité des pullulations sur les deux lots ne laissent rien à désirer.

On remarquera que les quatre derniers acides donnent lieu à des pullulations pareilles de microbes cocciformes. Sont-ils identiques? C'est une étude à faire qui ne présentera pas de difficultés sérieuses, si l'on prend soin de débiter par des cultures spontanées du genre de celles qui viennent d'être décrites.

PLAQUES A L'OXALATE DE SOUDE. — Dose : 0 gr. 2. Le reste comme précédemment. On ne remarque, au bout de quarante-huit heures, que de petites colonies de mucus hyalin sur *Esp.* appartenant à un petit bacille formant spores dans des articles renflés au milieu (forme *Clostridium*). Exactement le même organisme a paru plus tard sur *Tém.* Les pullulations sont restées pauvres, mais la réaction s'est approchée de 9,0 sur les deux lots.

Pour terminer avec les acides de la série grasse, mentionnons encore l'*acide oléique* que l'on a pris un peu au hasard, mais l'observation s'est montrée digne d'être mentionnée, à cause de la réaction toute différente des précédentes qu'elle a provoquée.

PLAQUES A L'OLÉATE DE SOUDE. — Dose : 0 gr. 2 par plaque. Même dose d'azote ammoniacal et nitrique. Même *pH*.

Durant trois jours, on ne distingue aucune végétation. Dans la suite, on ne voit pas apparaître de colonies bactériennes ou

rien que des traces. En revanche, les plaques, tant *Esp.* que *Tém.*, se couvrent de nombreuses touffes mycéliennes. Leur nombre atteint au moins 2.000 par gramme sur *Tém.*; il est environ quatre fois plus grand sur *Esp.*; le milieu n'est pourtant pas acide, car son  $pH$  est de 7,6. Plus tard il atteint 9,0 sur *Esp.* Les deux lots sont alors entièrement recouverts d'un épais duvet mycélien. Voilà donc un cas où les champignons seuls attaquent la matière à l'exclusion de tout autre organisme.

Passons aux alcools de la série grasse. Il n'y aurait presque rien à dire de l'alcool méthylique, qui a provoqué des pullulations trop pauvres pour juger de leur activité. Ce ne fut pas le cas avec l'alcool éthylique et butylique.

PLAQUES A L'ALCOOL ÉTHYLIQUE. — Dose : 2 cent. cubes par plaque. Azote ammoniacal et nitrique 5 milligr. Le  $pH$  est 7,0.

Au bout de deux jours, on remarque trois genres de colonies sur les deux lots : 1° gouttes hyalines incolores, bombées, assez massives; 2° petites colonies plates, sous forme d'enduit jaunâtre; 3° quelques rares touffes mycéliennes. On s'étonne de constater que les premières appartiennent à un *Azotobacter*; elles sont souillées par une petite coccobactérie, laquelle produit les végétations notées sous 2 (voir fig. 12, pl. II). On attribue l'apparition des *Azotobacter* à ce que la dose d'azote a été trop basse par rapport à la matière énergétique. On a élevé notamment la dose d'alcool par crainte d'une perte trop considérable par évaporation, en baissant en même temps la dose d'azote pour la même raison.

Dans une seconde expérience, on donne jusqu'à 10 milligr. 4 d'azote ammoniacal et nitrique par plaque, mais le caractère des pullulations ne change pas.

PLAQUES A L'ALCOOL BUTYLIQUE. — Dose : 2 cent. cubes. Azote et  $pH$  comme précédemment. Pour mieux différencier les colonies, on ensemence cette fois en grains de terre séparés. On en dépose une centaine des deux échantillons sur les plaques des deux lots.

L'examen au bout de quarante-huit heures donne un résultat

bien net. Il y a deux genres de colonies : 1° gouttes hyalines bombées, légèrement troubles : *Azotobacter*; 2° enduit blanchâtre à la lumière tombante, hyalin jaunâtre contre la lumière : même petite coccobactérie que dans la figure 12. Ce résultat est confirmé par une seconde expérience.

Les deux alcools ont donc provoqué les pullulations de l'*Azotobacter* qui a été jusqu'ici constamment absent sur les plaques pourvues d'azote combiné. Ce fait inattendu pourrait être déterminé par deux causes, dont l'une serait une prédilection spéciale de ce microbe pour ces alcools, l'autre la faible concurrence qu'il trouve sur un milieu, où les alcools sont offerts comme seul aliment. On reviendra à cette question à la suite de la série spéciale d'expériences consacrées aux fixateurs.

Le rôle des *composés aromatiques* dans le sol est encore peu connu. On y a signalé la présence de phénol et MM. Gray et Thornton (1) ont décrit un nombre d'espèces bactériennes qui paraissent pulluler à ses dépens et de quelques autres composés aromatiques, tels que crésol, résorcine, phloroglucine, quand ils sont présentés à faible dose ne dépassant pas 0,1 p. 100.

D'un autre côté, la lignine contient (ou plutôt est supposée contenir, car la structure chimique de ce corps est loin d'être établie définitivement) un ou plusieurs noyaux benzéniques, ce que l'on déduit du fait qu'elle donne de l'acide benzoïque et d'autres produits aromatiques lors de sa dislocation par voie chimique (2). Or, la lignine est, comme on le sait, un ingrédient très important des plantes qui entre pour 20-30 p. 100 dans leur composition. Il est donc bien régulièrement sujet à l'attaque des microbes du sol, dont on ne connaît encore malheureusement ni les agents, ni les produits. Les épreuves avec ces substances aromatiques, quoique anticipant en quelque sorte sur les notions établies, permettent tout de même quelques suggestions.]

Pour être sûr que les pullulations ont bien lieu aux dépens

(1) Soil Bacteria that decompose certain aromatic compounds. *Central. Bacter.*, II, 73, 1928, p. 74-96.

(2) Dr WALTER FUCHS. *Die Chemie des Lignins*. Berlin, 1926.



du noyau benzénique lui-même avec assimilation de ses débris, on a choisi les structures les plus simples, à savoir : le phénol, l'acide benzénique, l'acide salicylique.

PLAQUES AU PHÉNOL. — Dose : 0 gr. 1. Azote ammoniacal et nitrique : 5 milligr. 2. Au bout de trois jours, on ne distingue encore aucune végétation. Ce n'est qu'au bout de quelques semaines qu'apparaît un léger duvet de moisissures et quelques pauvres colonies bactériennes. L'odeur du phénol est encore bien sensible au bout d'un mois. Des doses plus faibles sont à éprouver.

PLAQUES AU BENZOATE DE SOUDE. — Dose : 0 gr. 1. Azote : comme ci-dessus. Au bout de deux jours, la surface de *Esp.* est couverte d'un léger duvet de moisissures. Sur *Tém.* il y en a moins. En fait de bactéries, on ne trouve que quelques colonies d'*Azotobacter*, apparues sur quelques points libres du duvet mycélien. Dans la suite, les plaques se recouvrent entièrement d'un épais duvet de moisissures. La réaction sur les deux est pourtant bien alcaline, car elle atteint et dépasse  $pH=9,0$  au bout de six jours.

SALICYLATE DE SOUDE. — Dose : 0 gr. 1. Azote : 5 milligr. 2. Le même résultat : les plaques se couvrent entièrement de moisissures. Au bout de cinq jours, végétations exubérantes. Aucune trace de colonies bactériennes. Le  $pH$  est 9,0 sur *Esp.*, sur *Tém.* près de 8,0.

#### SÉRIE SANS AZOTE.

Ce sont les fixateurs que l'on visait exclusivement dans ces expériences exécutées parallèlement avec les précédentes et en tout point de la même manière, sauf que l'on supprimait les quelques milligrammes d'azote combiné. Ceci déterminait d'avance la nature des organismes que l'on s'attendait à voir pulluler sur les plaques ; ce seraient les fixateurs, et rien qu'eux, dans le cas d'une substance énergétique répondant à leurs besoins, ou bien le milieu restera stérile dans le cas contraire, les non-fixateurs étant incapables de s'y développer.

Toutes les expériences peuvent donc être traitées ensemble, et il n'y aurait rien à dire sur les formules des plaques, sauf à rappeler la liste des corps chimiques offerts en qualité de substances énergétiques.

1. Formiate de soude.
2. Acétate de soude.
3. Butyrate de soude.
4. Propionate de soude.
5. Lactate de soude.
6. Tartrate de soude.
7. Succinate de soude.
8. Citrate de soude.
9. Oléate de soude.
10. Alcool méthylique.
11. Alcool éthylique.
12. Alcool butylique.
13. Phénol.
14. Benzoate de soude.
15. Salicylate de soude.

Rien n'a paru sur 1, 9, 10, 13 et 15. Sur toutes les autres plaques, sans exception, les végétations caractéristiques des *Azotobacter* constituaient seules la pullulation dominante. On voyait partout surgir rien que leurs colonies : mucus hyalin incolore, semi-liquide à l'état jeune, qui blanchit bientôt en se figeant, pour brunir plus ou moins à mesure du vieillissement de la culture. C'était tantôt la petite forme désignée ordinairement de *A. chroococcum*, tantôt la grande appelée *A. agilis*, tantôt des souches intermédiaires, ou un mélange de plusieurs. Les photographies 17 à 23, pl. III, numérotés dans l'ordre : acétate, butyrate, succinate, alcool éthylique, benzoate de soude illustrent les tableaux microscopiques de ces pullulations, qui sont, comme on le voit, tout à fait caractéristiques pour ce groupe.

Les végétations étaient décidément les moins abondantes sur propionate et butyrate. Elles étaient tout de même notables et parfaitement normales.

Des quatre acides sous les nos 5 à 8, c'est sur le lactate et le succinate que le développement était le plus rapide et le plus abondant.

Quant aux alcools, nous avons déjà noté le fait, que ces

fixateurs paraissent posséder une aptitude spéciale à les attaquer, dont n'est pas douée la majorité des bactéries, même en présence d'un excès d'azote assimilable; et puisque cette source d'énergie est également très médiocre pour les champignons, les *Azotobacter* peuvent s'implanter sur les plaques des deux séries. Trouvant tout de même quelque concurrence sur la première en présence de l'azote combiné, ils n'atteignent leur plein épanouissement que sur les plaques qui en sont dépourvues.

Les cultures sur plaques à l'alcool sont, certes, moins abondantes que sur les glucides, où l'organisme subit immédiatement une sorte d'hypertrophie, mais toujours belles et caractéristiques, malgré un brunissement moins précoce et moins accusé que sur d'autres substances. Des lignées de cultures pures à l'alcool éthylique ou butylique se laissent conduire indéfiniment, sans que l'on remarque des signes d'affaiblissement, ou de dégénérescence.

Mais de toutes les substances éprouvées c'est décidément l'acide benzoïque qui a donné les résultats les plus intéressants. Arrêtons-nous un instant sur les expériences qui s'y rapportent.

PLAQUES AU BENZOATE DE SOUDE.. Dose 0 gr. 1,  $pH = 6,9$ .

Au bout de deux à trois jours nombre considérable de colonies, toutes appartenant aux *Azotobacter*. Grande forme domine. Au bout de trois à quatre jours, ces colonies, bombées, hyalines, blanchissent et se figent. Le  $pH$  est  $= 8,0$ . Vers le huitième ou dixième jour les colonies deviennent brun-chocolat, rappelant vivement par leur aspect cette substance. En même temps, le gel autour des colonies prend une teinte fumée, noirâtre, jusqu'à ce que la couche entière du gel, y compris les parties libres de toute colonie, se présente noircie.

Au lieu du sel de soude, on peut employer le sel de chaux. Pour préparer la plaque, il est mieux alors de répandre la poudre sèche sur la surface du gel, laquelle s'y dissout en y pénétrant; on jette ensuite la solution saline à l'état bouillant et on laisse évaporer; on évite de cette manière la floculation qui apparaît, si l'on dissout les sels de chaux, dans la solution

ordinaire. Le gel devient ici encore plus rapidement noir à la culture des *Azotobacter*; des larges zones noircies se forment autour des colonies, encore blanches; quand celles-ci deviennent noires, toute la plaque se présente entièrement noire, comme de l'encre de Chine.

Il était intéressant de doser l'azote fixé aux dépens du benzoate, pour en comparer le taux avec celui que l'on obtient en se servant de la mannite.

EXPÉRIENCES DE FIXATION. — On prépare trois grandes plaques (20 centimètres de diamètre). On donne par plaque :

Benzoate de soude . . . . .	0 gr. 3
Carbonate de chaux . . . . .	0 gr. 2
Solution de sels . . . . .	10 cent. cubes
Potasse à 2 p. cent q. s. pour pH 7,0	

On laisse dix jours à l'étuve, jusqu'à ce que les colonies soient brunies au maximum. On sèche alors le gel, on jette dans un ballon Kjeldahl et on dose l'azote. On trouve en milligrammes, en déduisant 0,56 obtenu au dosage de la plaque témoin stérile.

1. . . . .	4,32
2. . . . .	4,87
3. . . . .	4,00 donc moyenne 4,39

Pour trouver le rapport, on ne compte évidemment que la dose des ions acides en déduisant la soude, ce qui donne environ 0 gr. 42. Le taux de l'azote fixé dépasse donc légèrement 1 p. 100 de la matière énergétique. Avec la mannite, il est plus souvent un peu au-dessous.

Pour passer au *pouvoir fixateur des sols*, rappelons que la question a été traitée longuement dans un mémoire antérieur (1), avec le résultat que la détermination de la densité des *Azotobacter* dans un sol donné permet une évaluation moins sujette à erreurs que le dosage du produit final en

(1) Etude sur la microbiologie du sol. Troisième mémoire. Ces *Annales*, 42, 1928.

azote fixé. C'est toujours de la mannite que l'on s'est servi pour ce but, substance pour ainsi dire classique depuis qu'elle a été recommandée par Beijerinck. Or, son emploi présente des inconvénients sérieux qui rendent l'opération moins sûre qu'elle pourrait l'être : le mucus hyalin liquide y paraît trop abondant, il se fige tardivement, il a donc tendance à confluer en flaques, ce qui rend les numérations difficiles et quelque peu arbitraires. On a donc hâte de les faire avant les quarante-huit heures quand les colonies sont encore petites, mais étant alors aqueuses, elles sont mal délimitées et mal visibles sur le fond hyalin du gel. De plus, il y a toujours sur ce milieu quelques colonies étrangères qui restent chétives et qu'il n'est pas difficile de distinguer de celles des *Azotobacter*, mais évidemment à condition de soumettre les plaques à un examen répété. Avant de remplacer la mannite par le benzoate, qui n'offre pas ces inconvénients, il s'agissait de voir si cette substance, d'un emploi nouveau, n'est pas sensiblement inférieure à la mannite comme provocatrice de pullulations spécifiques et comme moyen de déterminer les densités en question.

EXPÉRIENCES DE DÉNOMBREMENT. — Deux grandes plaques *Esp.* et *Tém.* recevant chacune :

Mannite . . . . .	4 gr. 5
Carbonate de chaux . . . . .	0 gr. 2
Solution de sels . . . . .	10 cent. cubes
Potasse à 2 p. cent q. s. pour $pH = 7,0$ .	

On enseme avec des suspensions des deux échantillons à la dose équivalant à 5 centigrammes de terre. Au bout de quarante-deux heures, on dénombre la plaque *Esp.* : il y a 109 colonies azotobactériennes, sans compter les chétives colonies bacillaires. Sur *Tém.*, les colonies étant peu nombreuses et encore peu développées, on remet le dénombrement au troisième jour. On trouve alors 26. Soit, totaux pour 1 gramme.

*Esp.* : 2.180.

*Tém.* : 520.

Deuxième expérience. — Quatre petites plaques à la mannite. Dose 0 gr. 3 par plaque. Le reste également à une dose cinq fois



moindre que précédemment. Ensemencement avec les mêmes suspensions à la dose équivalant à 1 centigramme par plaque. Dénombrement des plaques *Esp.* avant quarante-huit heures, des plaques *Tém.* pas avant trois jours. Le développement toujours lent des germes encore présents dans cette dernière doit être considéré comme un signe que ces germes s'y trouvent à l'état de repos.

Définitivement, les nombres sont :

<i>Esp.</i> :	pour un centigr.	20,	soit pour un gramme.	2.000
—	—	34	—	3.400
<i>Tém.</i> :	pour un centigr.	4,	soit pour un gramme.	400
—	—	5	—	500

Pour *Tém.* les trois épreuves sont bien d'accord, la moyenne étant 473. Pour *Esp.* l'accord est moins bon, ce qui s'explique parce que les difficultés d'un dénombrement exact augmentent rapidement à mesure que les plaques sont plus peuplées; la moyenne y est 2.525.

L'emploi du benzoate présente des avantages sérieux vis-à-vis de la mannite : le mucus n'y est pas si abondant, il n'y a plus de coulées, ni de confluence en flaques; il se fige plus vite et il brunit plus intensément. Il n'y a donc pas de raisons de se presser; on abandonne les plaques autant que l'on veut pour ne dénombrer que quand les colonies ont acquis cet aspect curieux de pastilles de chocolat plaquées sur le gel. De plus, les colonies bacillaires ne paraissent plus sur le gel, de sorte que l'on n'a plus à compter avec cette source d'erreurs; seules, de légères touffes mycéliennes apparaissent quelquefois, toujours tardivement, en surgissant non sur le gel libre, mais sur le mucus même des colonies. Les numérations se font donc le plus aisément possible.

EXPÉRIENCES DE DÉNOMBREMENT SUR LE BENZOATE. — Grande plaque à 0 gr. 5 benzoate de soude,ensemencée avec la terre *Esp.* Onensemence avec 5 centigrammes de terre en délayure. Après cinq jours d'étuve on abandonne la plaque pendant plusieurs semaines sur une table. Le dénombrement se fait sans consulter les chiffres des plaques à mannite que l'on a eu le temps d'oublier. La densité trouvée est 2.200 par gramme de terre.

Dans une seconde expérience, on ensemence avec une délayure de cette même terre à la dose équivalente à 2 centigrammes. On dénombre au bout de cinq jours d'étuve. Il y a 53 colonies, soit, pour 1 gramme, 2.650.

On voit donc que les chiffres sont sensiblement égaux à ceux que donne la mannite, substance réputée pour provoquer une pullulation exubérante des *Azotobacter*. On a donc tout avantage à la remplacer par le benzoate dans ce cas.

D'autres substances recommandables pour ce but ne manquent pas, dont l'emploi est plus avantageux que la mannite. Mentionnons surtout le *lactate de calcium*: on en prend 2 à 3 grammes par grande plaque, on dissout en ajoutant 10 cent. cubes de la solution minérale ordinaire et environ 20 cent. cubes d'eau, on chauffe à l'ébullition jusqu'à complète dissolution, on jette sur la plaque, on évapore. Les *Azotobacter* y pullulent assez abondamment sans produire de coulées, le mucus se fige sans tarder, et les colonies blanches se détachent bien sur le fond transparent du gel. Le brunissement est pourtant loin de celui que l'on obtient sur le benzoate. Les dénombrements sur ce milieu ont donné des chiffres sensiblement égaux aux précédents.

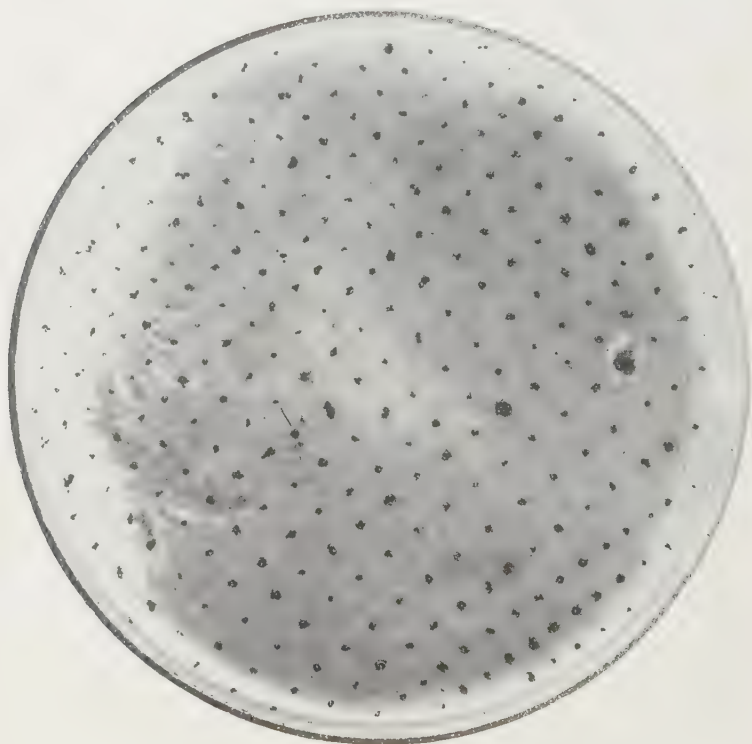
En traitant des *Azotobacter*, il y a actuellement encore un point à mettre bien en relief, un caractère physiologique qui est à la base même de la fonction fixatrice : nous entendons l'hydrogénation de l'azote gazeux avec formation d'ammoniac que nous avons établi récemment (1). Il est remarquable avec quelle facilité cette constatation a été faite, aussitôt que diverses autres substances ont remplacé la mannite sur nos plaques. L'ammoniac s'est imposé immédiatement, non seulement à la suite d'épreuves sensibles, mais simplement à l'odorat. Comment ne pas dire que c'est le choix, assez malheureux, de la mannite, comme soi-disant aliment de prédilection du microbe, qui a masqué pendant près d'une trentaine d'années la vraie nature chimique de la fonction fixatrice, en imprimant aux expériences, tellement nombreuses, un tour trop artificiel ! Sur ce problème trop important pour être traité

(1) Sur la synthèse de l'ammoniac par les *Azotobacter* du sol. *C. R. Ac. Sc.*, t. 190, p. 661, 1930.

en passant dans ce mémoire consacré exclusivement à la méthode, nous reviendrons dans un prochain mémoire, où l'on trouvera une description détaillée des observations qui s'y rapportent.

#### MICROBES DE LA NITRIFICATION.

Une méthode d'analyse microbiologique du sol serait bien incomplète, si elle ne comprenait une opération destinée à ces

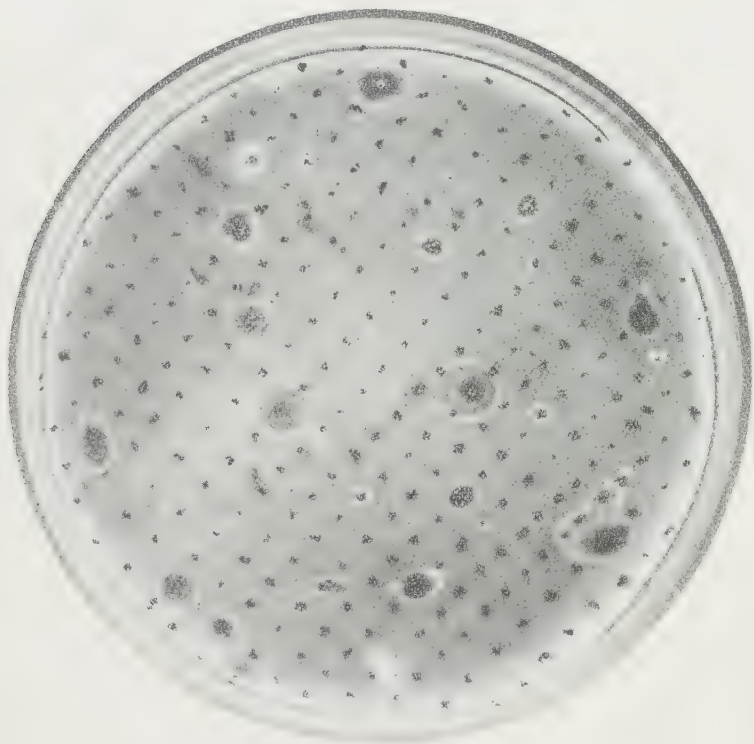


Nitratisation sur plaque *Tém.* Grandeur naturelle.

microbes. Dans la note déjà citée à l'Académie des Sciences, nous avons indiqué une méthode qui consiste à enduire le gel silicique avec une base carbonatée — carbonate de calcium, de magnésium ou avec du phosphate ammoniaco-magnésien. En ensemençant ces plaques avec de la terre à dose très faible,

soit en y rangeant un nombre de grains, les taches ou trous de corrosion dans l'enduit, qui sont produits par les microbes de la *nitritation*, sont proportionnels à leur densité dans l'échantillon, et en donnent un tableau bien net. Les figures ci-contre, qui représentent des plaques *Esp.* et *Tém.* après un séjour de deux semaines à l'étuve, en donnent un exemple caractéristique. Les pullulations de la nitrosomonade s'y trouvent à l'état de pureté microscopique : voir figure 24, pl. III.

Pour la *nitratation* la seule méthode est de soumettre les



Nitratation sur plaque *Esp.* Grandeur naturelle.

plaques aux épreuves chimiques. Le phénomène étant essentiellement lent, les différences entre une terre active et une autre à activité affaiblie sont toujours très prononcées. Il semble même que la nitratation s'affaiblisse plus facilement que la nitritation, ce qui conduit parfois à la persistance

des nitrites dans le sol, comme cela a été constaté dans notre terre *Témoin*.

Tout le problème de la nitrification demandant une révision, l'on se bornera, cette fois, à ces quelques observations, avec le dessein d'y revenir prochainement dans un mémoire spécialement consacré aux microbes de la nitrification.

#### DISCUSSION. — CONCLUSIONS.

Quelque incomplètes que soient les expériences décrites, elles démontrent, à notre avis, l'efficacité de la méthode, qui permet d'approcher des fonctions *naturelles* des microbes du sol, — sujet resté, jusqu'ici, en dehors de toute investigation, — ainsi que des facteurs qui régissent les réactions de la collectivité microbienne. Car il s'agit dans le sol, non d'un amas d'espèces quelconques, mais d'un véritable *appareil microbien* qui s'est constitué au cours d'innombrables siècles et qui répond aux sources d'énergie qui lui viennent du dehors, toujours avec un maximum de rendement. Ce maximum ne peut être dû, ici comme ailleurs, qu'au principe de la division de travail, lequel trouve son expression dans les affinités ou aptitudes spéciales des membres de la collectivité.

Cette conception n'est qu'une hypothèse en l'état actuel de nos connaissances, mais les expériences d'après la nouvelle méthode la rendent infiniment probable. Voyons les faits qui parlent en sa faveur, ainsi que toutes les conclusions et suggestions apportées par ces expériences.

I. On a vu un choix de corps chimiques divers provoquer, dans chaque cas, des pullulations différentes bien caractérisées. L'attaque se déclenche souvent avec une rapidité surprenante, et l'agent actif s'impose à l'attention, parfois à l'état quasi pur. Il est possible de faire défiler ainsi les formes microbiennes du milieu sol et de reconnaître, de cette manière, leurs fonctions naturelles. La division du travail ou, si l'on veut, la répartition des rôles est donc évidente; il est évident aussi que des aptitudes spéciales sont nécessaires pour les remplir; et quant au rendement, c'est la compétition — particulièrement lorsqu'il s'agit d'un bon aliment — qui déterminera le maximum, vu que seule la forme qui devancera toutes



les autres pourra profiter de la source d'énergie offerte. Les observations qui illustrent ces réactions de la collectivité n'ont pas manqué, à savoir : les pullulations exclusives de bacilles filamenteux sur la peptone et sur l'asparagine, la prédominance des Spirochètes sur l'acétate et le butyrate, les cultures presque pures des coccobactéries sur les acides organiques, des vibrions et cytophages sur les fibres, le règne des *Azotobacter* sur les plaques sans azote, l'apparition exclusive des champignons sur certaines substances, l'activité des nitrificateurs dans des conditions toutes spéciales, du reste, déjà connues.

II. L'activité de la population microbienne paraît assez résistante envers les conditions extérieures, soit envers le traitement. Huit à dix ans d'inanition ont bien ralenti l'activité de notre parcelle *Tém.*, mais elle est restée tout de même capable d'attaquer toute la série des substances offertes. Le retard était parfois peu sensible, plus souvent bien net. Il y avait aussi des cas où l'action était à peine ébauchée. En somme, qualitativement, l'activité est restée la même et on a retrouvé les mêmes agents dans la majorité des cas, quoique beaucoup moins nombreux. La seule exception marquée touche à la multiplication des Spirochètes qui a été bien marquée dans *Esp.*, mais dont on n'a pas retrouvé trace dans *Tém.*

III. La différence dans la rapidité des processus se prête tout de même à des épreuves comparées de l'activité des différents échantillons de terre. Sans vouloir, dès maintenant, arrêter un programme définitif de ces épreuves, on pourrait, provisoirement, y comprendre les 7 à 8 épreuves qui suivent :

1. Plaques à la peptone ou l'asparagine.
2. Plaques à la cellulose, avec dénombrement.
3. Plaques à l'acétate ou au butyrate.
4. Plaques au lactate ou au succinate.
5. Plaques au benzoate ou au lactate de calcium sans azote, avec dénombrement.
6. Plaques enduites pour nitrification.
7. Plaques nitrifiées pour nitrification.

On pourrait y joindre le dénombrement traditionnel, sur gélose de Waksman ou de Thornton, pour profiter des indications que donne cette opération sur le groupe des germes dociles à la culture sur ces milieux.

De toutes ces épreuves, celles qui concernent les deux phases de la nitrification sont assez longues, demandant deux à trois semaines; celles qui touchent à la cellulose et la fixation environ cinq jours, le reste douze à quarante-huit heures.

IV. Il est évident que l'étude approfondie des espèces dont on aurait établi, par sélection physiologique, la fonction naturelle pourrait suivre, et qu'elle se ferait au moyen de la culture pure. En débutant d'après la méthode par cette sélection, on aurait tout de suite une idée de leurs fonctions de prédilection et, partant, du milieu le plus favorable à leur culture. On pourrait alors, en sortant du cadre de l'Agrobiologie, étudier de plus près non seulement leurs aptitudes spéciales, mais aussi leurs aptitudes potentielles, soit toute la gamme des processus qu'elles sont capables de provoquer à l'état isolé.

V. C'est en ce qui concerne le problème de la fixation de l'azote que ces expériences apportent les lumières qui manquaient. Deux points restaient obscurs : 1<sup>o</sup> Les fixateurs aérobies sont-ils nombreux et variés, ou bien cette faculté remarquable de fixer l'azote en l'hydrogénant est-il l'apanage exclusif des *Azotobacter*? La question a été déjà discutée dans notre troisième mémoire avec la conclusion que les nombreuses espèces auxquelles plusieurs auteurs ont reconnu une certaine activité fixatrice n'en sont capables qu'en culture pure, sous certaines conditions tout artificielles, mais ne paraissent jamais sur les *cultures spontanées*; ce qui nous les a fait désigner sous le nom de *fixateurs artificiels* vis-à-vis des *Azotobacter* qui sont des *fixateurs naturels*. Or, des recherches soigneuses sur les méthodes d'analyse appliquées aux cultures microbiennes exécutées par Hopkins (1) et par Marie Löhnis (2) ont apporté la conviction qu'il ne s'agit même pas de fixation artificielle, mais qu'il y a, au moins dans la majorité des cas, simplement erreur d'analyse : on se méprenait sur la signification de la différence entre culture et témoin en la prenant pour un gain en azote, tandis qu'il n'y avait, en réalité, que manque de perte. De ce fait, le terrain a été déblayé des cas de fixation dou-

(1) Studies on nitrogen fixation, etc. *Soil Science*, 23, 1929, p. 433-447; voir analyse *Bull. Inst. Pasteur*, 28, 1930, p. 497.

(2) Can bacterium radicicola assimilate nitrogen? *Soil Science*, 29, 1930, p. 37; voir analyse *Bull. Inst. Pasteur*, 29, p. 674.

teuse sans qu'il y ait besoin d'invoquer des artifices de culture. Le groupe *Azotobacter* reste seul comme fixateur avéré dans les conditions normales du sol, soit quand l'accès de l'air y est libre. Ce rôle exclusif est nettement démontré par nos expériences, où il s'est imposé, en présence de toute la collectivité, comme seul agent de la fixation sur les milieux privés d'azote, qu'il a envahis sans hésitation, en maître absolu. 2° Aux dépens de quelles substances peut-il pulluler dans le sol en exerçant l'hydrogénation de l'azote gazeux? Un quart de siècle de recherches n'a pas apporté de réponse satisfaisante à cette question, même sous forme d'une hypothèse probable. La raison en est à chercher principalement dans la formule classique du milieu à mannite ou glucose, universellement adopté pour la culture de ces microbes; trop artificielle, elle a, on pourrait dire, masqué leur rôle au sein du sol. Rares dans le sol et très rapidement détruits, les glucides ne pouvaient être considérés comme une source d'énergie disponible pour les fixateurs. Quelle est donc celle qu'ils utilisent, s'ils sont incapables, comme on le sait, d'attaquer la cellulose, l'hémicellulose, les pentosanes, et la lignine? Cette incertitude a conduit plusieurs auteurs à nier le rôle important que l'on attribuait aux *Azotobacter*. Comme s'exprime Waksman (1) le problème tant controversé ne pourrait trouver une solution que si l'on écarte l'incertitude qui existe sur la source d'énergie disponible pour les *Azotobacter* dans la nature. Eh bien, les expériences décrites nous paraissent apporter la réponse cherchée. On a vu que les *Azotobacter* sont capables de pulluler abondamment aux dépens de corps à constitution très simple, ce que l'on savait déjà, sans estimer ce fait à sa juste valeur. Or, ces substances — alcool éthylique et butylique, acide acétique et butyrique et même les acides lactique et succinique — sont les produits les plus banaux de toutes les fermentations. Si l'on considère que les *Azotobacter* les utilisent en fixant l'azote, et cela sans concurrence possible dans un milieu qui est privé d'azote combiné, il devient facile de concrétiser les modalités de leur activité dans la nature. Que l'on se figure de la matière végétale fraîche attaquée par les microbes du sol : le peu de glucides et de

(1) *Loc. cit.*, p. 63.

protides qu'elle contient disparaît le plus rapidement, en laissant des produits de fermentation et de l'ammoniaque; le processus se ralentit quand le tour vient au squelette végétal — pectine, pentosanes, cellulose, hémicellulose, lignine — lesquels donnent en se décomposant, si la réserve en azote assimilable n'est pas encore épuisée, sensiblement les mêmes déchets; d'autres encore, peut-être, non encore signalés, appartenant à la série aromatique. Mais, la matière végétale étant pauvre en azote, le moment est facilement atteint, quand la provision apportée par la plante enfouie dans le sol s'épuise, et s'il ne peut être emprunté à l'ambiance, le processus de décomposition finirait par s'arrêter. C'est alors le moment de l'entrée en action des *Azotobacter*, et ce sont les produits de décomposition des matières solubles, ainsi que du squelette, qui composent la source d'énergie qui est à leur entière disposition pour pulvuliser en hydrogénant l'azote atmosphérique. On se figure aisément que ces deux ordres de phénomènes — décomposition d'un côté, fixation de l'autre — peuvent se succéder plusieurs fois autour de la plante enfouie, jusqu'à sa transformation définitive en matière humique. A la suite des expériences pratiquées d'après la nouvelle méthode, cette hypothèse, si l'on veut, devient d'une probabilité qui s'approche de la certitude. En tout cas, on ne voit pas d'objection à lui opposer. On y trouve l'interprétation de quelques expériences où l'on obtenait en associant les fixateurs aux ferments cellulosiques quelque gain en azote fixé (Hutchinson et Clayton, Pringsheim, Makrinoff).

VI. Quel est le rôle des champignons dans le sol arable? Un certain nombre d'espèces en ont été isolées et cultivées sur différents milieux, tels que gélatine sucrée, pain, riz, décoction de pruneaux, etc., où les cultures ont été luxuriantes, sans qu'elles puissent jamais conduire à quelque conclusion que ce soit sur le rôle de ces organismes dans le milieu naturel. Ce rôle se confond en quelque sorte avec celui des bactéries et des actinomycètes. Toutes les formules des milieux de cultures sont à peu près valables pour les trois groupes. Et si une réaction acide gêne la majorité des bactéries jusqu'à paralyser leur développement, la réciproque n'est pas vraie par rapport à l'influence de la réaction alcaline sur les mucédinées. Toute observation sur la question du rôle des champignons qui n'a



encore fait l'objet d'aucune étude expérimentale est donc intéressante à noter. On en trouve quelques-unes dans nos expériences. Rappelons-les brièvement : 1° La végétation des bactéries étant beaucoup plus rapide que celle des mucédinées, en même temps que leurs germes plus nombreux dans le sol, ce sont toujours les bactéries qui ont le dessus, lorsqu'il s'agit d'un aliment qu'elles recherchent et qui est susceptible de subir une rapide décomposition. Les mycéliums, comme on l'a vu, n'ont jamais eu le temps de s'implanter sur les plaques à peptone, corps aminés, glucides, acides organiques, etc. ; 2° Mais s'il s'agit d'une substance plus résistante, insoluble ou antiseptique, dont l'attaque est lente, on voit surgir des touffes mycéliennes plus ou moins abondantes. Leur ingérence dans le processus de la dégradation de la cellulose est constante. Dans ce cas, on observe le plus clairement le caractère secondaire, en quelque sorte, de leur action : les premières touffes n'apparaissent que tardivement, au bout de quelques jours, quand la trame du papier ou du tissu est déjà envahie par les vibrions et les *Cytophaga*, et quand leur activité paraît même à son déclin. A ce moment, les fibres donnent déjà la réaction classique de l'oxycellulose (voir 4<sup>e</sup> mémoire). Tout cela paraît indiquer que le phénomène de la dégradation marche en deux étapes, dont la première est conduite par les bactéries, la seconde par les champignons ; que cette première étape se ralentisse ou s'arrête à un moment, quand un ou plusieurs des groupements alcooliques de la cellulose passent à l'état de groupements carboxyliques, tandis que la seconde continue sur cette cellulose oxydée ayant acquis les propriétés d'un acide. La modification chimique de la substance paraît donc dans ce cas départager les rôles ; 3° Dans le cas où les bactéries sont incapables d'attaquer la substance, ce sont les mycéliums qui s'en chargent. On a vu, comme exemples, les milieux à oléate, à phénol, à benzoate, à salicylate, rester libres de bactéries et se couvrir lentement de duvet mycélien. La tolérance des champignons paraît donc plus considérable que celle des bactéries, ainsi que leurs moyens d'attaque des structures moléculaires résistantes. Il est possible qu'un rôle important leur soit réservé par rapport à la lignine, à en juger par l'activité bien connue des espèces de champignons destructeurs de bois,



et c'est dans cette direction que l'on devra conduire les recherches. Enfin, 4<sup>e</sup> sur les milieux sans azote, les champignons ne paraissent pas, quelle que soit la substance énergétique offerte, d'où l'on serait autorisé à conclure que la fixation de l'azote ne compte pas parmi leurs fonctions. Quelques résultats contraires obtenus en culture pure seraient à attribuer à des erreurs d'analyses, qui guettent l'observateur dans des expériences de ce genre.

VII. On remarquera que, dans aucun cas, l'apparition des actinomycètes n'a été notée sur nos plaques. Et, pourtant, ces organismes sont nombreux dans le sol. Comment expliquer cette contradiction? Pour tenter de l'expliquer, on est obligé de sortir du cadre de ces expériences pour mentionner des observations encore inédites, quoique datant déjà de plusieurs années. Elles seront ici à leur place, car elles sont susceptibles de suggérer la réponse qui manque.

Voici ces observations : On prépare des plaques de silicogel enduites de la matière humique du sol que l'on obtient comme suit. En se servant de terre fertile ou de terreau, on en extrait la matière noire au moyen d'une solution d'ammoniaque ; on chasse l'excès de celle-ci en chauffant au bain-marie ; on étend la solution avec beaucoup d'eau, on précipite avec une solution de chlorure de chaux ; on laisse déposer le précipité floconneux, puis on lave par décantation avec une grande quantité d'eau. On délaie le dépôt dans un peu d'eau et on verse une dose appropriée de cette suspension brune sur la surface des plaques siliciques, sans autre addition. On évapore comme d'ordinaire et onensemence l'enduit brun avec des particules de terre. Au bout de deux à quatre semaines, on distingue deux genres de végétation : 1<sup>o</sup> légers voiles, tantôt irisés, tantôt blanchâtres et comme pulvérulents, qui s'étendent avec une lenteur extrême sur la surface. Ces voiles extrêmement délicats sont composés tantôt de bâtonnets minuscules, dont un photogramme reproduit l'aspect dans notre premier mémoire (p. 339, fig. 21) ; tantôt de coccus, minuscules aussi, rangés en mérisme ; 2<sup>o</sup> colonies d'actinomycètes dont le développement est également très lent, mais qui deviennent au bout de plusieurs semaines assez importantes pour être considérées comme végétation dominante sur les plaques. En dehors des orga-

nismes de ces légers voiles et des boutons d'actinomycètes, aucune autre végétation bactérienne, ni de champignons ne s'y développent. Le fait nous indique que les actinomycètes s'accommodent des matières humiques comme seul aliment, lesquelles sont à considérer comme le résidu des actions microbiennes sur la substance des végétaux. Ces organismes se contentent donc du rebut des autres, et cette conclusion s'accorde bien avec le fait du développement extrêmement lent qui leur est propre et qui les met en état d'infériorité évidente dans toutes les compétitions autour de la matière énergétique.

### LÉGENDE DES PLANCHES

*Clichés de M. Jeantet. Grossissement environ 1.000.*

#### PLANCHE I.

- Photogr. n° 1. — Plaque à la peptone. Pullulation dominante : bacille filamenteux.  
Photogr. n° 2. — Plaque à l'asparagine. Pullulation dominante : bacille filamenteux.  
Photogr. n° 3. — Plaque à la cellulose. Taches jaunes : *Cellvibrions*.  
Photogr. n° 4. — Plaque à la cellulose. Taches vertes : fuseaux (ou faucilles).  
Photogr. n° 5. — Plaque à la cellulose. Taches orange fibrolytiques : *Cytophaga*.  
Photogr. n° 6. — Plaque à la cellulose. Taches jaunes : *Cytophaga*.  
Photogr. n° 7. — Plaque au formiate. Pullulation dominante : coccobactérie.  
Photogr. n° 8. — Plaque à l'acétate *Esp*. Pullulation dominante : spirochètes.

#### PLANCHE II.

- Photogr. n° 9. — Plaque à l'acétate *Tém*. Pullulation dominante : bacille sporogène en chapelets.  
Photogr. n° 10. — Plaque au butyrate *Esp*. Pullulation dominante : spirochète. Pullulation secondaire : coccus.  
Photogr. n° 11. — Plaque au butyrate *Tém*. Pullulation dominante : coccus.  
Photogr. n° 12. — Plaque à l'alcool éthylique. Pullulation dominante : coccus.  
Photogr. n° 13. — Plaque au lactate. Pullulation dominante : courts bâtonnets asporogènes (coccobactéries).  
Photogr. n° 14. — Plaque au tartrate. Pullulation dominante : courts bâtonnets asporogènes (coccobactéries).  
Photogr. n° 15. — Plaque au citrate. Pullulation dominante : courts bâtonnets asporogènes (coccobactéries).  
Photogr. n° 16. — Plaque au succinate. Pullulation dominante : courts bâtonnets asporogènes (coccobactéries).

## PLANCHE III.

- Photogr. n° 17. — Plaque à l'acétate sans azote : *Azotobacter*, petite forme.  
Photogr. n° 18. — Plaque au butyrate sans azote : *Azotobacter*, grande forme.  
Photogr. n° 19. — Plaque au succinate sans azote : *Azotobacter*, grande forme.  
Photogr. n° 20. — Plaque à l'alcool éthylique sans azote : *Azotobacter*, petite forme.  
Photogr. n° 21. — Plaque au benzoate sans azote : *Azotobacter*, cellules jeunes entourées de gaines massives.  
Photogr. n° 22. — Plaque au benzoate sans azote : *Azotobacter*, cellules plus âgées.  
Photogr. n° 23. — Plaque au benzoate sans azote : *Azotobacter*, groupes enkystés brunis.  
Photogr. n° 24. — Plaque pour nitrification. *Nitrosomonas* prise sur une tache de corrosion de l'enduit.
- 

Le Gérant : G. MASSON.

FIG. 2. — Asparagine.

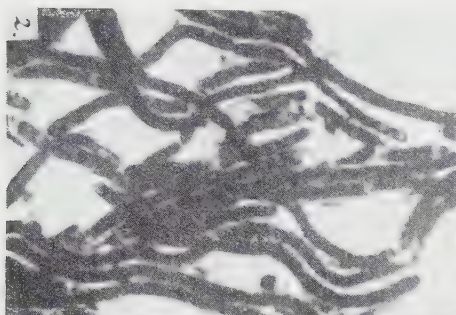


FIG. 1. — Peptone.

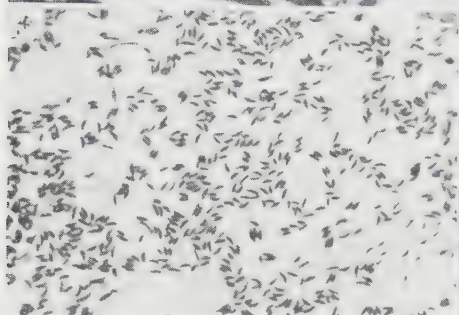
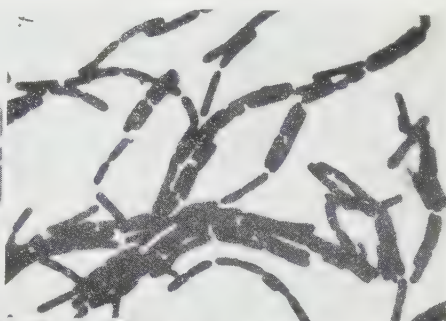


FIG. 4. — Cellulose (*Cellfalcicule*).

FIG. 3. — Cellulose (*Cellvibron*).

FIG. 6. — Cellulose (*Cytophaga*).

FIG. 5. — Cellulose (*Cytophaga*).

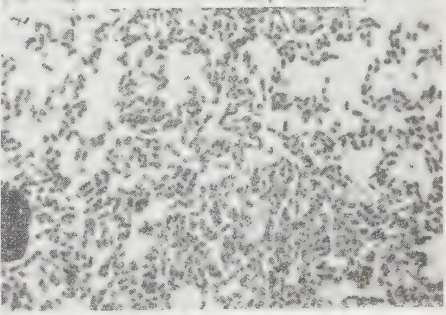
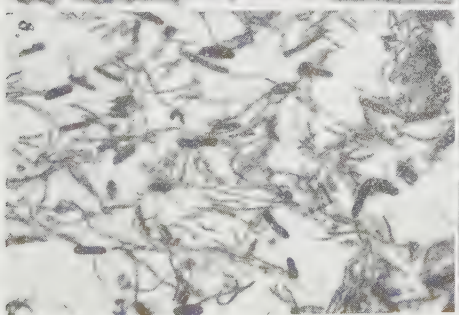
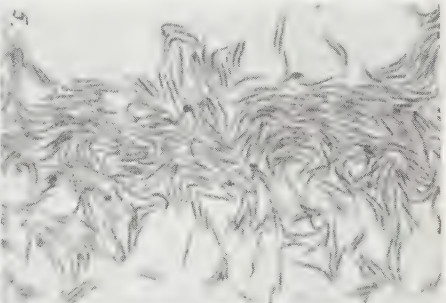
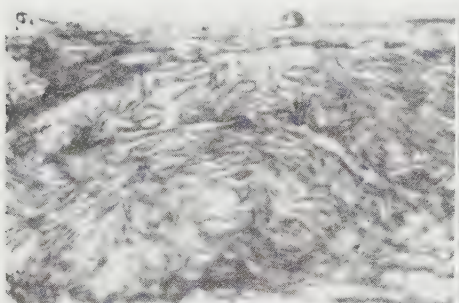


FIG. 8. — Acétate *Esp.*

FIG. 7. — Formiate.



FIG. 10. — Butyrate *Esp.*

FIG. 9. Acétate *Tém.*

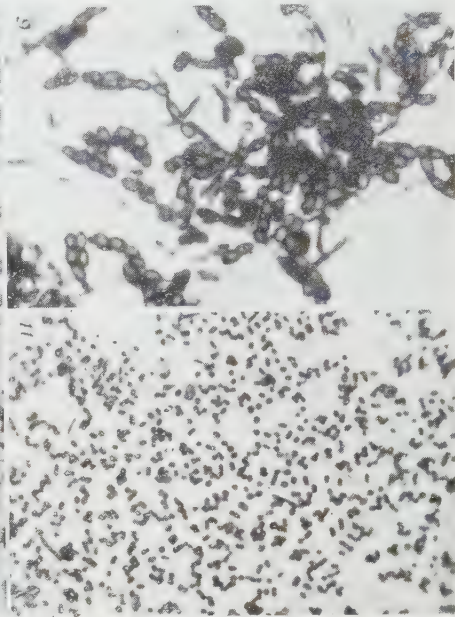
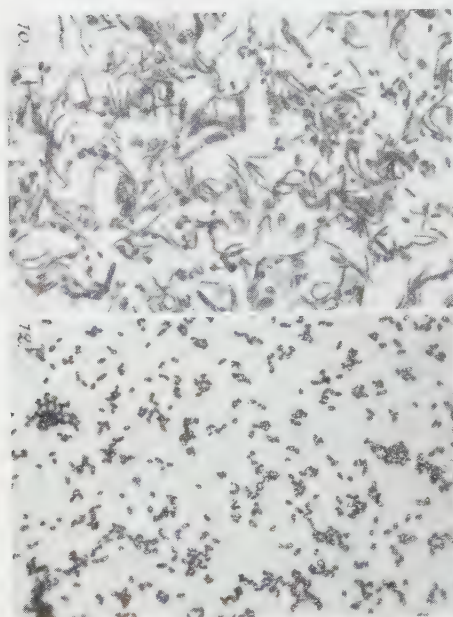


FIG. 12. — Alcool éthyl.

FIG. 11. — Butyrate *Tém.*

FIG. 14. — Tartrate.

FIG. 13. — Lactate.

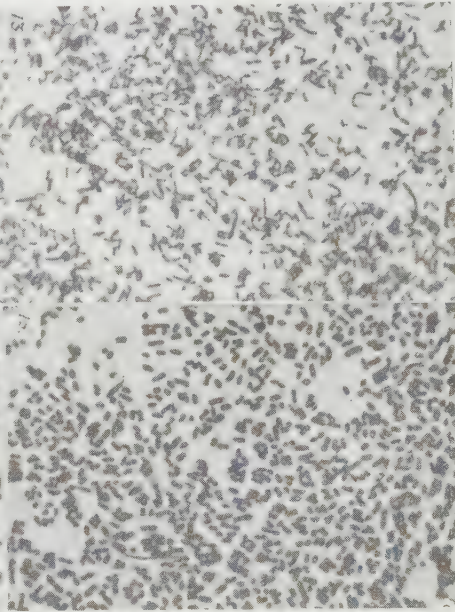
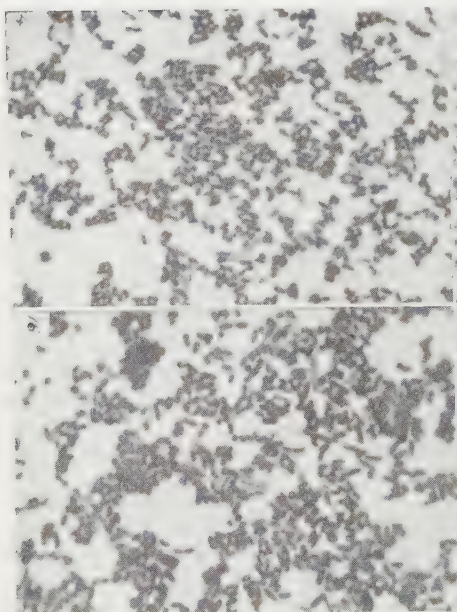


FIG. 16. — Succinate.

FIG. 15. — Citrate.



FIG. 18. — Butyrate sans azote  
(*Azotobacter*).

FIG. 17. — Acétate sans azote  
(*Azotobacter*).

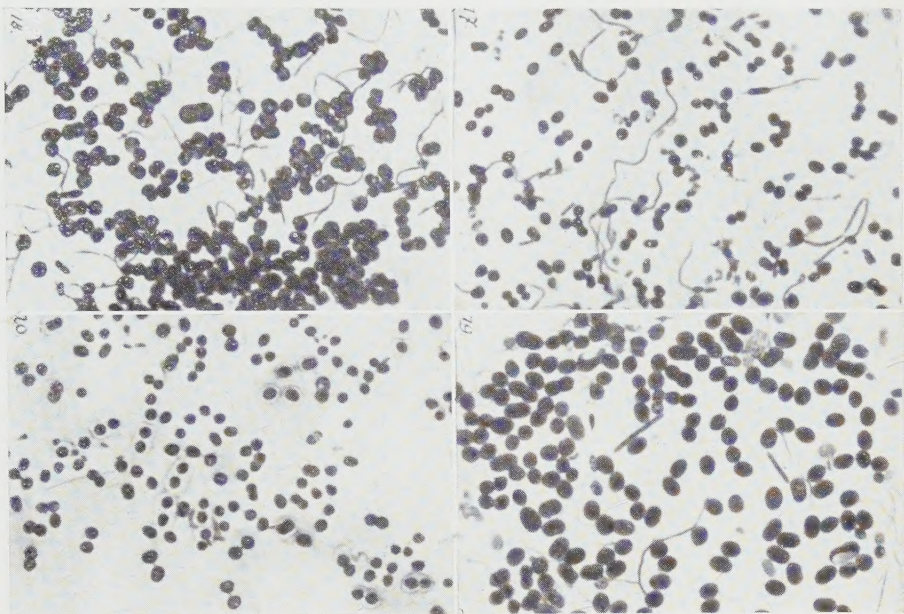


FIG. 20. — Alcool éthylique sans azote  
(*Azotobacter*).

FIG. 19. — Succinate sans azote  
(*Azotobacter*).

FIG. 22. — Benzoate sans azote  
(*Azotobacter*).

FIG. 21. — Benzoate sans azote  
(*Azotobacter*).

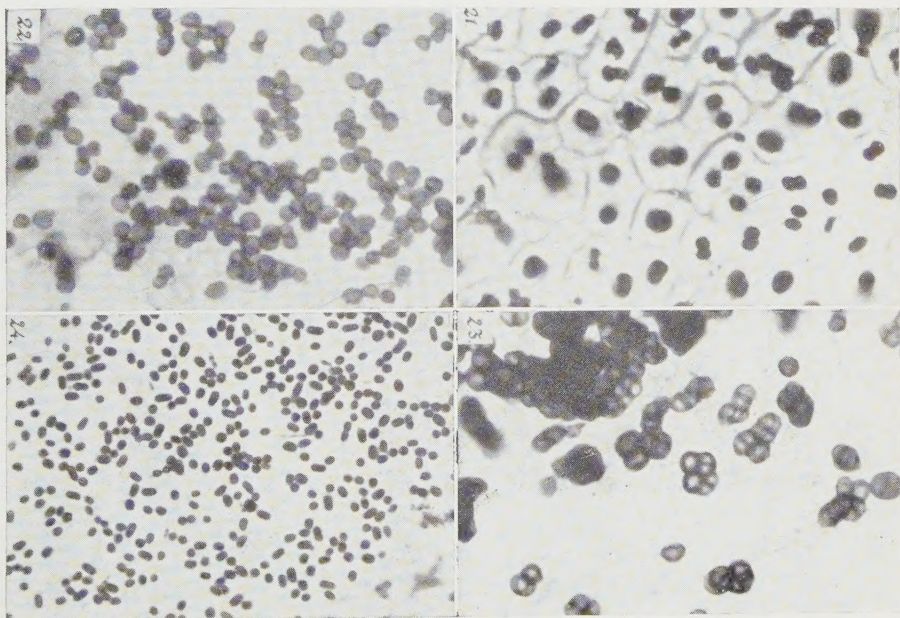


FIG. 24. — Nitrification (*Nitrosomonas*).

FIG. 23. — Benzoate sans azote  
(*Azotobacter enkysté*).





